



# **Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

**Facultad de Farmacia y Bioquímica**

**Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica**

## **“Evaluación de la efectividad de dos medios de criopreservación para obtener una máxima viabilidad y recuperación de PBMCs”**

### **TESIS**

**Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico**

### **AUTOR**

**Sergio Renán QUEVEDO TORRES**

### **ASESORES**

**María Elena SALAZAR SALVATIERRA**

**Melissa Marlene MÉNDEZ ARANDA**

**Lima, Perú**

**2018**



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Quevedo S. “Evaluación de la efectividad de dos medios de criopreservación para obtener una máxima viabilidad y recuperación de PBMCs” [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2018.

---



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**  
Universidad del Perú. Decana de América  
**Facultad de Farmacia y Bioquímica**  
**Decanato**



**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS**

Los Miembros del Jurado Examinador y Calificador de la Tesis titulada:

**"Evaluación de la efectividad de dos medios de crio-preservación para obtener una máxima viabilidad y recuperación de PBMCs"**

Que presenta el Bachiller en Farmacia y Bioquímica:


**SERGIO RENÁN QUEVEDO TORRES**

Que reunidos en la fecha se llevó a cabo la **SUSTENTACIÓN** de la **TESIS**, y después de las respuestas satisfactorias a las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado, y practicada la votación han obtenido la siguiente calificación:

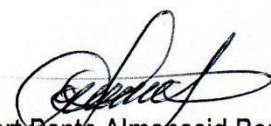
19 (DIECINUEVE) CON MENCIÓN

en conformidad con el Art. 34.º del Reglamento para la obtención del Grado Académico de Bachiller en Farmacia y Bioquímica y Título Profesional de Químico Farmacéutico(a) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Lima, 05 de setiembre de 2018.

  
Dr. Juan Manuel Parreño Tipián  
Presidente

  
Dr. Víctor Crispín Pérez  
Miembro

  
Q.F. Robert Dante Almonacid Román  
Miembro

  
Q.F. Gustavo Antonio Guerra Brizuela  
Miembro

**"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"**

Agradecimientos:

*En primer lugar, quisiera agradecer a la PhD. Melissa Méndez por su dedicación y orientación constante durante todo el desarrollo de la presente tesis. De la misma manera, agradecer a la Dra. María Elena Salazar, por sus consejos y apoyo constante a lo largo de toda mi vida universitaria. Finalmente, quisiera agradecer a mis padres, quienes siempre han alentado mis decisiones y me han inculcado los valores que me han permitido desarrollarme como persona.*

*El presente trabajo de investigación ha sido posible gracias al financiamiento otorgado por **INNOVATE PERÚ** a través del Convenio N° 080-INNOVATEPERU-BRI-2016.*

## INDICE

ÍNDICE DE TABLAS .....	1
ÍNDICE DE FIGURAS .....	2
GLOSARIO DE TÉRMINOS .....	3
RESUMEN .....	4
ABSTRACT .....	5
I. INTRODUCCIÓN .....	6
II. OBJETIVOS .....	9
II.1. Objetivo general .....	9
II.2. Objetivos específicos .....	9
III. MARCO TEÓRICO .....	10
III.1. Cultivos celulares .....	10
III.1.1. Tipos de células cultivables .....	11
III.1.2. Células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) .....	13
III.2. Criopreservación de células: Aspectos generales .....	15
III.2.1. Factores involucrados durante la criopreservación .....	18
III.3. Antecedentes .....	23
IV. PARTE EXPERIMENTAL .....	31
IV.1. Tipo de estudio .....	31
IV.2. Variables del Estudio .....	31
IV.3. Lugar de estudio .....	31
IV.4. Materiales y Reactivos .....	31

IV.5. Flujiograma del trabajo experimental .....	33
IV.6. Procedimientos .....	34
IV.6.1. Recolección de muestras .....	34
IV.6.2. Aislamiento de PBMCs .....	37
IV.6.3 Criopreservación de PBMCs .....	42
IV.6.3.1. Ensayo 1: Evaluación de la efectividad del medio de criopreservación .....	42
IV.6.3.2. Ensayo 2: Efecto del tiempo de almacenamiento sobre la efectividad de la criopreservación .....	44
IV.6.3.3. Ensayo 3: Efecto del tipo de contenedor de congelación sobre la efectividad de la criopreservación .....	45
IV.6.4. Descongelamiento de PBMCs .....	47
IV.6.5. Análisis Estadístico .....	48
V. RESULTADOS .....	49
V.1. Efectividad del medio de criopreservación: Medio convencional vs. CryoStor CS10® .....	49
V.2. Efecto el tiempo de almacenamiento: Dos semanas vs Un mes .....	52
V.3. Efecto del tipo de contenedor de congelación: Mr.Frosty® vs CoolCell® ...	54
VI. DISCUSIÓN .....	57
VII. CONCLUSIONES .....	61
VIII. RECOMENDACIONES .....	62
IX. BIBLIOGRAFÍA .....	63

X. ANEXOS .....	76
ANEXO 1: Tabla de Operacionalización de Variables .....	76
ANEXO 2: Consentimiento informado y ficha de datos de los participantes ...	78
ANEXO 3: Descripción de los medios y/o materiales comerciales a evaluar ..	84
ANEXO 4: Composición y preparación de medios y soluciones .....	86



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Viabilidad (%) y recuperación celular (%) de PBMCs criopreservados con medio convencional y con CryoStor CS10® .....	49
<b>Tabla 2:</b> Viabilidad (%) y recuperación celular (%) de PBMCs criopreservados durante dos semanas y un mes .....	52
<b>Tabla 3:</b> Viabilidad (%) y recuperación celular (%) de PBMCs criopreservados empleando un contenedor Mr Frosty® y un contenedor CoolCell® .....	55

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Imagen de un linfocito y de un monocito .....	15
<b>Figura 2:</b> Etapas de la conservación y procesamiento de muestras biológicas que requieren de optimización .....	18
<b>Figura 3:</b> Parámetros más importantes a controlar durante la criopreservación de células .....	22
<b>Figura 4:</b> (A) Sistema completo de extracción. (B) Toma de muestra .....	34
<b>Figura 5:</b> Cuadrícula de recuento de la cámara de Neubauer .....	40
<b>Figura 6:</b> Esquema de proceso de separación de PBMCs de la sangre .....	41
<b>Figura 7:</b> Viabilidad de PBMCs (n=6 donantes) al emplear dos medios de criopreservación .....	50
<b>Figura 8:</b> Recuperación de PBMCs (n= 6 donantes) al emplear dos medios de criopreservación .....	51
<b>Figura 9:</b> Efecto del tiempo de almacenamiento (Dos semanas o Un mes) sobre la viabilidad de PBMCs (n=6 donantes) .....	53
<b>Figura 10:</b> Efecto del tiempo de almacenamiento (Dos semanas o Un mes) sobre la recuperación de PBMCs (n=6 donantes) .....	54
<b>Figura 11:</b> Efecto del contenedor de congelación (Mr Frosty® o CoolCell®) sobre la viabilidad de PBMCs (n=6 donantes) .....	56
<b>Figura 12:</b> Efecto del contenedor de congelación (Mr Frosty® o CoolCell®) sobre la recuperación de PBMCs (n=6 donantes).....	56

## **GLOSARIO DE TÉRMINOS**

DMSO: Dimetilsulfóxido

FBS: Suero Bovino Fetal

GMP: Buenas Prácticas de Manufactura

KRG: Krebs-Ringer-Glucosa

NL: Nitrógeno líquido

PBMCs: Células Mononucleares de Sangre Periférica

## RESUMEN

**Introducción:** La optimización de un protocolo de criopreservación requiere la evaluación de parámetros para preservar la máxima cantidad de células viables y funcionales. **Objetivos:** Evaluar la efectividad de dos medios de criopreservación para obtener una máxima viabilidad y recuperación de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs); y, de manera complementaria, evaluar los efectos del tiempo de almacenamiento y del contenedor de congelación sobre la efectividad del método de criopreservación que emplee el medio más efectivo. **Metodología:** Los PBMCs fueron obtenidos de la sangre de 15 donantes sanos mediante centrifugación por gradiente de densidad. El porcentaje de la viabilidad (V) y la recuperación celular (R) se determinaron mediante conteo celular en cámara de Neubauer, empleando el colorante azul de tripano. Los PBMCs obtenidos fueron criopreservados a -80 °C, empleando el medio de criopreservación (convencional y/o CryoStor CS10®), el contenedor de congelación (Mr Frosty® y/o CoolCell®) y el tiempo de almacenamiento (dos semanas y/o un mes) específico para cada ensayo. **Resultados y Conclusiones:** Ambos medios fueron efectivos, con medianas de V y R superiores al 85% y al 50% respectivamente y no se observó una diferencia significativa entre los valores de ambos medios. El medio convencional fue determinado como el más adecuado, debido a su menor coste. Los valores de V y R obtenidos luego de un mes de almacenamiento se consideraron efectivos, con valores de 92.05% y 54.25% respectivamente. Finalmente, el contenedor CoolCell® demostró ser más efectivo que el Mr Frosty®, con medianas de V y R de 95.5% y 71.9% respectivamente.

**Palabras claves:** criopreservación, PBMCs, viabilidad y recuperación celular, CryoStor CS10®.

## ABSTRACT

**Introduction:** The optimization of a cryopreservation protocol requires the evaluation of parameters to preserve the maximum number of viable and functional cells. **Objectives:** Evaluate the effectiveness of two cryopreservation media to obtain maximum viability and recovery of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs); and, complementarily, evaluate the effects of storage time and the freezing container on the effectiveness of a cryopreservation method, which uses the most effective medium. **Methodology:** The PBMCs were obtained from the blood of 15 healthy donors by density gradient centrifugation. The percentage of viability (V) and cell recovery (R) were determined by cell count in a Neubauer chamber, using the trypan blue dye. The obtained PBMCs were cryopreserved at -80 °C, using the specific cryopreservation medium (conventional and / or CryoStor CS10®), the freezing container (Mr Frosty® and / or CoolCell®) and the storage time (two weeks and / or a month) for each assay. **Results and Conclusions:** Both media were effective, with medians of V and R greater than 85% and 50% respectively, and no significant difference was observed between the values of both media. The conventional medium was determined as the most appropriate, due to its lower cost. The medians of V and R obtained after one month of storage were considered effective, with values of 92.05% and 54.25% respectively. Finally, the CoolCell® container proved to be more effective than Mr Frosty®, with medians of V and R of 95.5% and 71.9% respectively.

**Key words:** cryopreservation, PBMCs, viability and cell recovery, CryoStor CS10®.

## **I. INTRODUCCIÓN**

Los estudios sobre los mecanismos involucrados en el desarrollo de diversas enfermedades (inmunológicas, infecciosas y congénitas) se sostienen en la utilización de modelos biológicos y bioquímicos (animales de experimentación, órganos, cultivo de tejidos, cultivo de células, metabolitos, entre otros). Las células constituyen las unidades vivas autónomas más pequeñas pero que a su vez presentan un alto grado de complejidad y organización estructural y funcional, que los convierten en candidatos idóneos para estudios genéticos, metabólicos y de señalización bioquímica relacionadas al desarrollo de una enfermedad y cómo el organismo prepara un mecanismo de defensa.

Los cultivos celulares presentan ventajas éticas, económicas y logísticas frente a modelos de estudio animal (1), además se han convertido en modelos muy específicos para distintos tipos de cáncer (2). Sin embargo, el procesamiento de células obtenidas de tejidos requiere de procedimientos sofisticados ya que las células una vez extraídas del organismo requieren un ambiente fisicoquímico (presencia de O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, temperatura y pH específicos) bastante definido y un medio nutricional exigente, con el fin de evitar la alteración del metabolismo celular y se desencadene el proceso de apoptosis (3,4). Por eso, una vez aislada, la muestra de células, deben ser cultivadas de manera inmediata en un laboratorio con el nivel de bioseguridad adecuado y por personal capacitado.

En numerosas ocasiones, los donantes de muestras no pueden trasladarse a los laboratorios debido a las distancias. Esto ocurre frecuentemente en estudios epidemiológicos donde se desea determinar la prevalencia de cierta patología en diferentes regiones de un país o en estudios sobre enfermedades endémicas en

zonas de difícil acceso (5). En el Perú, el acceso a ciertas comunidades del interior del país para coleccionar muestras clínicas se torna bastante complicado debido a factores geográficos (lugares remotos sin acceso vehicular), económicos (falta de recursos para trasladar un equipo especializado a dichos lugares), entre otros (6). En estos casos, el procesamiento inmediato de células se vuelve casi imposible.

Esto se vuelve sumamente crítico en estudios donde se requieren determinadas poblaciones celulares que representan un porcentaje mínimo dentro de la muestra, como el caso de los monocitos y algunas células polimorfonucleares de la sangre.

La crio-preservación o criopreservación, mediante el sometimiento de muestras a temperaturas frías extremas, constituye un sistema fundamental para la conservación de células y el mantenimiento de sus características estructurales y propiedades funcionales. El proceso de criopreservación consta de diferentes etapas relacionadas al acondicionamiento de la muestra, la congelación, el transporte y el descongelamiento de las células. En la estandarización de un protocolo de criopreservación debe considerar factores como el agente crioprotector, la tasa de congelación, tiempo de almacenamiento, tasa de descongelamiento, entre otros, que resulten adecuados para el tipo de ensayos celulares que se quieran realizar posteriormente (7). Ensayos que requieren un máximo número de células estructuralmente intactas y funcionales. La presente tesis surge con la finalidad de responder a una interrogante del proyecto “Polarización y niveles de glutatión del macrófago en la co-infección por tuberculosis y helmintos”, proyecto financiado por el programa **INNOVATE PERÚ** del Ministerio de la Producción (Convenio N° 080-INNOVATEPERU-BRI-2016). Se buscó optimizar un sistema de criopreservación para células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) con el fin de obtener una máxima recuperación de

células viables. De esta manera, se hace posible el estudio del rol de estas poblaciones celulares en procesos infecciosos, como la tuberculosis. Además, los resultados y conclusiones desprendidos del siguiente trabajo podrán servir como una guía referencial para cualquier laboratorio o investigador que desee implementar un sistema de criopreservación de PBMCs.



## **II. OBJETIVOS**

### **II.1. Objetivo general**

- ✓ Evaluar la efectividad de dos medios de criopreservación para obtener una máxima viabilidad y recuperación de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs); y, de manera complementaria, evaluar los efectos del tiempo de almacenamiento y del contenedor de congelación sobre la efectividad del método de criopreservación que emplee el medio más efectivo.

### **II.2. Objetivos específicos**

- ✓ Comparar los porcentajes de viabilidad y recuperación celular obtenidos al emplear un medio de criopreservación convencional (FBS 90% y DMSO 10%) y uno comercial (CryoStor CS10®).
- ✓ Comparar los porcentajes de viabilidad y recuperación celular durante dos períodos de almacenamiento diferentes, empleando el medio de criopreservación más efectivo.
- ✓ Comparar los porcentajes de viabilidad y recuperación celular al emplear dos tipos de contenedor de congelación (Mr Frosty® y CoolCell®), empleando el medio de criopreservación más efectivo.

### **III. MARCO TEÓRICO**

#### **III.1. Cultivos celulares**

Un cultivo celular puede ser definido como un modelo *in vitro* que permite el mantenimiento de células vivas, metabólicas y funcionalmente activas bajo condiciones controladas muy semejantes a las encontradas en los organismos vivos de los cuales derivan, son empleados en investigación clínica como plataformas para recrear condiciones fisiológicas y/o fisiopatológicas del cuerpo humano que se desean estudiar.

Dichos cultivos requieren del control de una serie de factores fisicoquímicos como una temperatura adecuada (37 °C), un pH específico que a su vez estaría controlado por una proporción constante de ciertos gases (p.ej. 5-10% de CO<sub>2</sub>), así como de medios de cultivo que les brinden todos los componentes nutricionales (glucosa, aminoácidos, sales, factores de crecimiento, etc.) (3,8) que las células necesitan para su crecimiento, metabolismo y proliferación. Además, durante el trabajo con células se debe procurar la esterilidad en todo el proceso mediante el uso de cabinas de flujo laminar en ambientes controlados ya que existe un gran riesgo de contaminación por otros microorganismos (9) como los mycoplasmas (10), virus (11), otras especies de células (como las células HeLa) (12) o elementos pirógenos. Estos últimos llegan a ser especialmente perjudiciales para el cultivo de células inmunes. Una prueba de esto, es que muchas de las pruebas de detección del pirógeno LPS (endotoxina bacteriana) emplean cultivos de monocitos debido a su gran sensibilidad frente a este pirógeno (13). El uso de antibióticos y antifúngicos es altamente recomendado.

### **III.1.1. Tipos de células cultivables**

#### **A. Cultivo celular primario**

Son aquellos que derivan de tejidos de organismos vivos y pueden obtenerse por disgregación celular mediante métodos enzimáticos o mecánicos. Dependiendo del tipo de células cultivada, estos cultivos tienen una capacidad de proliferación reducida o nula.

#### **B. Cultivo de líneas celulares continuas**

Son aquellas que pueden proliferar de manera indefinida. Surgen a veces de manera espontánea a partir de un cultivo primario como en el caso de algunas células tumorales. Otras veces, sus orígenes responden a la fabricación a “gran escala” en los laboratorios para uso comercial. Inicialmente, estas últimas surgieron a partir del tejido tumoral de pacientes y/o animales, como es el caso de las líneas celulares HeLa, las cuales derivaron de células de cáncer cervical de Henrietta Lacks en 1951, siendo considerada la primera línea celular cancerosa (14), otro ejemplo son las líneas de monocitos THP-1 derivadas de sangre periférica de un infante con un caso de leucemia monocítica aguda (15). Con el desarrollo de la biotecnología, las líneas empezaron a ser diseñadas mediante la alteración del material genético, por métodos como la transfección o la transducción, de células primarias. Este es el caso de las líneas de células HEK 293 derivados de células de riñón humano embrionario a los cuales se les transfecta ADN del Adenovirus 5 (16). Estas células son a menudo utilizadas para transfectar genes con el fin de expresar proteínas de interés como agentes terapéuticos entre otros.

Las líneas celulares comerciales presentan una serie de ventajas sobre los cultivos primarios como su robustez, su crecimiento rápido y la posibilidad de realizar varios pasajes luego del cultivo inicial (17). Sin embargo, en muchas ocasiones, se sigue considerando a los cultivos primarios como los modelos *in vitro* más adecuados para diferentes tipos de ensayos ya que los resultados obtenidos son más extrapolables al comportamiento de las células en el organismo. Las líneas celulares derivadas de tejidos tumorales presentan un metabolismo diferente al de las células sanas y un ciclo celular más acelerado. Además un elevado de número de pasajes en estos cultivos puede llevar a la alteración funcional y morfológica de las células (14). La alteración genética a las que son sometidas algunos tipos de líneas celulares podría alterar el fenotipo celular, así como la respuesta a estímulos y las funciones propias de las células (17,18).

Las células pueden permanecer en un cultivo como monocapas superficiales (adheridas sobre un soporte plástico o de vidrio) como en la gran mayoría o en suspensión (inmersas en el medio de cultivo líquido como en el caso de algunas células hematopoyéticas).

Existen diversas aplicaciones de los cultivos celulares en investigación clínica y molecular (8) como estudios de señalización intracelular (19), estudios de enfermedades infecciosas (20-22), ensayos farmacológicos y toxicológicos (23), estudios en genómica y proteómica (24,25); además de aplicaciones biotecnológicas como la producción de anticuerpos y hormonas (26,27), la producción de tejidos artificiales (28) y nuevas tecnologías en diseño de fármacos (29,30).

Los cultivos celulares presentan ventajas importantes sobre otros modelos de estudio como la uniformidad de la población celular, la economía de recursos o menor rigurosidad en cuestiones éticas frente a modelos como el animal (8). Sin embargo, también pueden suponer algunas limitaciones como la imposibilidad de estudiar la interacción de las distintas especies de células con los componentes de la matriz extracelular que encuentran en el organismo (17).

### **III.1.2. Células mononucleares de sangre periférica (PBMCs)**

Las células mononucleares de la sangre periférica (PBMCs por sus siglas en inglés), son células del sistema inmune que poseen un núcleo redondeado. Estas incluyen a los linfocitos y a los monocitos (ver Figura 1) (31).

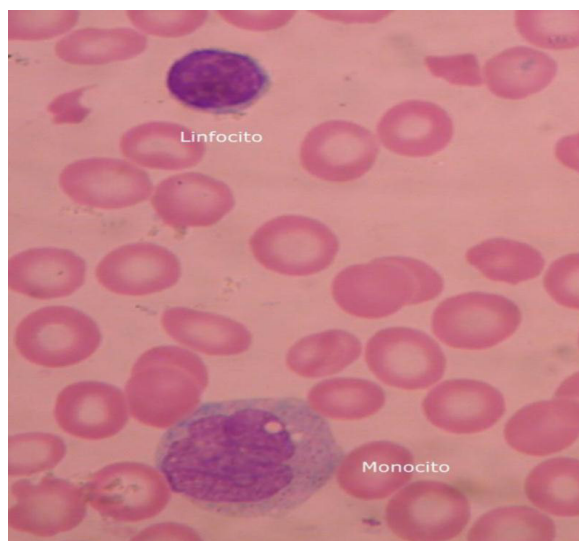
Dentro de las subpoblaciones que conforman los PBMCs, los linfocitos representan la más numerosa (70 al 90% de PBMCs). Éstos se dividen en 2 grandes subpoblaciones: los linfocitos B y los linfocitos T. Los linfocitos B maduran en el bazo fetal y en la médula ósea roja adulta, cumplen el rol principal de la producción de anticuerpos (32, 33) durante la respuesta inmune; sin embargo, también cumplen otras funciones importantes como la activación de la respuesta de los linfocitos T, así como la regulación de la neogénesis del tejido linfoide, la cicatrización de heridas y el rechazo del organismo a injertos (33). De otro lado, los linfocitos T, los cuales maduran en el timo, representa una subpoblación mucha más heterogénea. Las distintas subdivisiones, agrupadas según el tipo de receptor T (TCR) (34) cumplen una función específica, interaccionando éstos a su vez entre sí (35). Los linfocitos cumplen las funciones de reconocimiento del antígeno, la activación, regulación y supresión de la respuesta inmunológica celular, así como la memoria inmunológica (32, 36).

La otra subpoblación que conforman los PBMCs son los monocitos, quienes maduran en la médula ósea roja y representan del 10 al 30% de los PBMCs, sin embargo cumplen funciones bastante importantes en la sangre. Quizás la función más reconocida sea la de ser precursor de los macrófagos y células dendríticas, células especializadas cuya función principal es la fagocitosis y la presentación del antígeno a los linfocitos, no obstante, en situaciones como procesos inflamatorias, se ha comprobado que los monocitos pueden producir sustancias efectoras relacionadas a la eliminación de patógenos (37).

El aislamiento y conservación de PBMCs de la sangre para un posterior cultivo diferenciado de monocitos a macrófagos requiere de todos los cuidados posibles durante su manipulación y una monitorización continua. Sobre todo por el menor porcentaje de monocitos frente a linfocitos y además a su fragilidad al tratarse de células primarias. De lo expuesto anteriormente, podemos deducir que los PBMCs cumplen un rol clave en el proceso de defensa del organismo, por lo que resultan cultivos idóneos para distintos ensayos inmunológicos como el estudio de respuesta del organismo frente a infecciones, inmunoterapia contra el cáncer (38), entre otros.

La técnica de aislamiento de PBMCs se basa en la diferencia de densidades de los componentes sanguíneos (células, plaquetas, plasma) que permiten su separación mediante la centrifugación por gradiente de densidad. Para esta centrifugación se utiliza un medio que posee una densidad similar al tipo de célula que se quiere aislar. Los PBMCs poseen una densidad no mayor a 1.077 g/mL. Los medios de gradiente que podemos encontrar en el mercado con esta densidad son: Ficoll®, Lymphoprep® y Lymphosep®.

Luego de la centrifugación se obtiene una capa delgada de color blanquecino ubicada sobre el medio de gradiente. Esta capa se denomina “buffy coat” y contiene a los PBMCs (31).



**Figura 1.** Imagen microscópica de un linfocito y un monocito. Fuente: Telmeds.org (Atlas de Hematología) (39).

### **III.2. Criopreservación de células: Aspectos generales**

La preservación de muestras biológicas permite asegurar el mantenimiento de las características estructurales y bioquímicas de dichas muestras, bajo condiciones controladas durante períodos establecidos de almacenamiento.

Fuera de los organismos vivos y bajo condiciones de temperatura ambiente prolongados, los diferentes componentes de las muestras biológicas (tejidos, fluidos, células) tienden a degradarse rápidamente debido a las condiciones de estrés que atraviesan, como: la falta de suministro de oxígeno continuo, la falta de nutrientes esenciales y la acumulación de sustancias de desecho (40). Así mismo, la alteración del metabolismo puede generar la activación de rutas metabólicas alternas que incrementan la acidez, reduciendo el pH, conllevando a la muerte

celular. La preservación de células a corto plazo (horas a días) se realiza generalmente bajo condiciones hipotérmicas (entre 2 °C a 8 °C). Con esto se consigue desacelerar los procesos metabólicos. Adicionalmente, durante el transporte y manejo de muestras el uso de hielo permite reducir la degradación de proteínas (41). Para una preservación de células a largo plazo (semanas, meses y años), la criopreservación es el método de elección.

La criopreservación se define como la exposición de una muestra biológica a temperaturas frías extremas (desde -80 °C hasta -196 °C), para detener los procesos metabólicos celulares y de mantener la estructura celular lo más íntegramente posible durante un tiempo determinado. Ahora bien, con el sometimiento de las células a temperaturas extremadamente bajas sin un control adecuado, podrían aparecer fenómenos responsables del daño y muerte celular durante la congelación. Entre ellos se encuentran: la formación de hielo y el aumento en la concentración de solutos, tanto en el medio extracelular como intracelular (40, 42-43).

De manera más detallada, el proceso se inicia con la formación de cristales de hielo a nivel extracelular, provocando la disminución de agua líquida y por lo tanto se aumenta la concentración de solutos en el medio extracelular. Para mantener el equilibrio osmótico, el agua del medio intracelular atraviesa la membrana plasmática hacia el exterior, y de esta manera se incrementa la concentración de solutos al interior de la célula (7,40).

Si las células son congeladas de manera muy rápida, el agua que sale del medio intracelular al extracelular es menor, causando una mayor formación de cristales



de hielo en el medio intracelular. Esto puede causar un daño irreparable a la célula y, en el peor de los casos, la lisis celular (43).

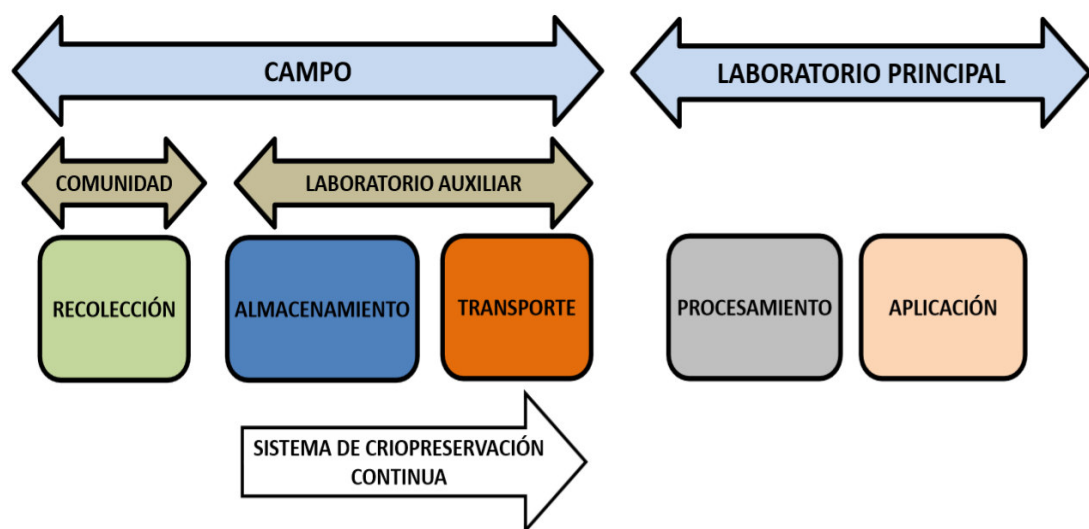
Por el contrario, si las células son congeladas lentamente, el agua que sale del medio intracelular al extracelular es mayor, ocasionando una mayor concentración de solutos al interior de la célula. Esto trae como consecuencia una serie de cambios físicos y bioquímicos como la desnaturalización de proteínas y alteraciones en el pH (7, 42).

Adicionalmente, existen otros dos efectos potenciales derivados de la criopreservación. Éstos inciden sobre la conformación de la membrana plasmática y la actividad de la mitocondria. A temperaturas bajas extremas, la membrana plasmática sufre cambios conformacionales producto de la pérdida de fluidez de la bicapa lipídica, debido a la solidificación de los lípidos; afectando así la permeabilidad de la membrana y, por consecuencia, al transporte de iones y moléculas a través de ésta. En el caso de la mitocondria, el estrés producido por la congelación reduce su actividad metabólica, provocando la disminución de la síntesis de ATP. Esta molécula aporta la energía indispensable para el funcionamiento de las bombas de iones-dependientes de ATP, encargadas del transporte activo a través de la membrana. Por consecuencia, la actividad de dichas bombas se vería suprimidas (42). Ambos fenómenos serían responsables del desbalance iónico de las células que podrían conllevar a la muerte celular.

Todos los cambios celulares descritos previamente pueden llevar a una muerte celular inmediata e incluso activar el proceso de muerte celular programada o apoptosis. Si este proceso se activa, continuaría luego de que se descongelen las

células previamente criopreservadas, ya sea en el transcurso de horas o días, disminuyendo así el tamaño de la población celular inicial (7,43).

Todo lo mencionado anteriormente, pone en evidencia la gran importancia de optimizar y monitorizar las etapas de la criopreservación celular (Ver Figura 2). Actualmente, con el aumento de las investigaciones biomédicas que involucran cohortes de mayor expansión geográfica, la recolección de muestras se lleva a cabo en comunidades cada vez más alejadas. Debido a esto, las etapas de almacenamiento y transporte cobran mayor relevancia, siendo crítica su optimización y monitorización (40).



**Figura 2.** Etapas de la conservación y procesamiento de muestras biológicas que requieren de optimización. Esquema basado en el flujograma de trabajo de un estudio de campo.

Adaptado de Matthews y col. (40).

### III.2.1. Factores involucrados durante la criopreservación

Existen una serie de factores importantes para la supervivencia celular que hay que controlar durante las distintas etapas de la criopreservación (Ver Figura 3).

## **A. Agentes crioprotectores**

El descubrimiento accidental en 1948 por Polge y col. de que el uso del glicerol permitía la sobrevivencia de espermatozoides de aves a  $-70^{\circ}\text{C}$ , marcó no sólo el inicio del desarrollo del método de criopreservación (43); sino además, puso en evidencia la importancia del uso de ciertas sustancias que ayudan al correcto congelamiento de las células, los llamados agentes crioprotectores.

Se definen como agentes crioprotectores a aquellas sustancias hidrosolubles que disminuyen el punto eutéctico de una solución dada (punto más bajo de cristalización posible para todos los componentes de un sistema) (42). En el caso de la criopreservación, esto representaría la disminución del punto de congelación al interior de las células. Estos agentes generan un gradiente de presión osmótica permitiendo la salida del agua y, a su vez, reemplazarían la función de solvente del agua al interior de la célula; previniendo así la formación de hielo intracelular y la concentración de solutos al interior (44). Existen varios tipos de sustancias crioprotectoras con características distintas en términos de polaridad, estructura química, carga eléctrica. Estos se pueden clasificar en dos grandes grupos.

- **Los crioprotectores penetrantes:** Están conformados por compuestos de bajo peso molecular que penetran al interior de la célula. Dichos agentes pasan a través de la membrana celular y reemplazan el volumen de agua intracelular evitando la formación de hielo intracelular, y, a su vez manteniendo el volumen celular previniendo así una deshidratación excesiva por gradiente osmótico (45).

Entre los principales tenemos al glicerol, el dimetilsulfóxido (DMSO) y el propanediol (PROH). Dentro de todos ellos, el DMSO es el más utilizado debido a

su gran desempeño en procesos de congelación a velocidad controlada. Sin embargo, al igual que otros agentes, es tóxico a temperatura ambiente y su paso a través de la membrana es más lento que el agua, lo cual en ciertas ocasiones, puede ocasionar un desbalance osmótico. Por lo tanto, se debe tener especial cuidado con la temperatura (2 a 8 °C) y la concentración de DMSO en el medio que se añade a las células, generalmente 10% (7).

**-Los crioprotectores no penetrantes:** Generalmente, no penetran al interior de la célula. Están conformados por moléculas de gran peso molecular como la sacarosa, la dextrosa, almidón, lipoproteínas, el dextrano y la polivinilpirrolidona (PVP). Estas moléculas incrementan la concentración de solutos en el medio extracelular, provocando la deshidratación celular al generar un gradiente osmótico que ocasiona la salida del agua (46). Se usan generalmente asociados a crioprotectores penetrantes para reemplazar en parte el volumen de agua al interior de la célula. La actividad crioprotectora de estas moléculas podría además estar asociada a su capacidad de formar puentes de hidrógeno con el agua, lo que reduciría la actividad del agua líquida en la célula (42). Estos agentes son más eficientes en sistemas de congelación rápida.

## **B. Tasa de congelación**

La velocidad con la cual las células se congelan tiene un gran impacto en la recuperación de células viables (40, 43-44).

Las tasas (velocidades) muy lentas de congelación si bien reducen la formación de hielo intracelular aún más, exponen por mayor tiempo las células a los agentes crioprotectores y a los cambios osmóticos lo cual podría tener un efecto tóxico y de pérdida de volumen celular. Por otro lado, las tasas rápidas de congelación si bien

reducen la exposición a los crioprotectores y a los cambios osmóticos, puede incrementar la formación de hielo intracelular (44).

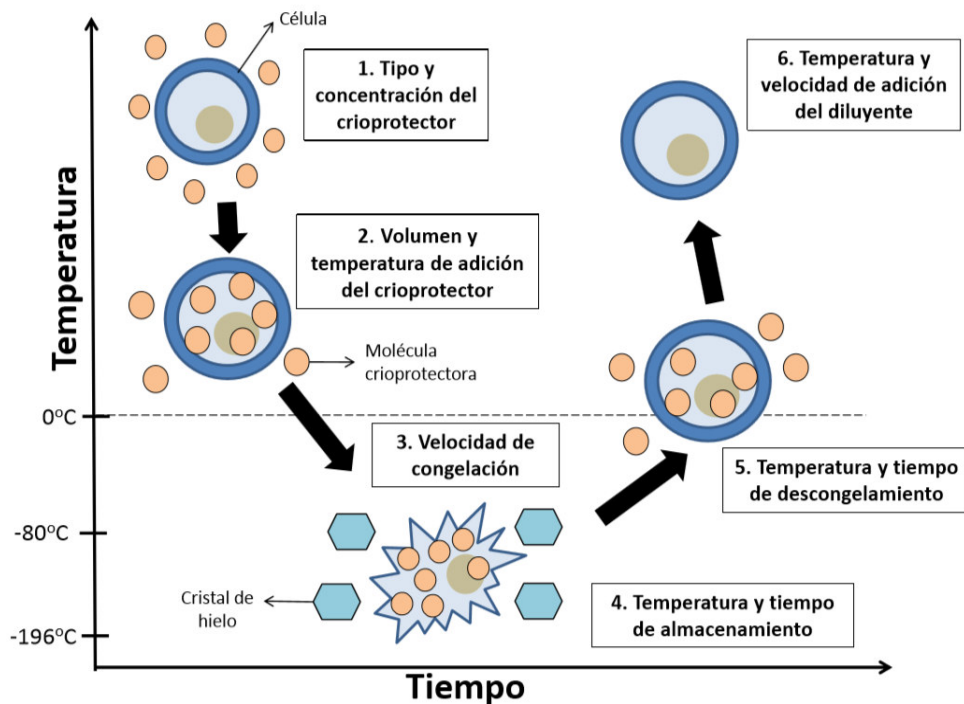
Para lograr un buen control de la tasa de congelación se pueden emplear congeladoras y/o tanques de nitrógeno de velocidad controlada, los cuales permiten programar la tasa de congelación deseada de manera constante; sin embargo no muchos laboratorios pueden adquirir este tipo de equipos debido a sus elevados costos. Uno de los métodos alternativos más utilizados es el empleo de contenedores de congelación. Se trata de envases que aíslan los crioviales de las condiciones de temperatura del entorno, y al ser ingresados a un congelador o tanque de nitrógeno enfrían las células a una tasa de congelación establecida y reproducible ( $-1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ ). Dentro de estos el más conocido es el llamado Mr Frosty<sup>®</sup>, contenedor plástico que requiere de un volumen determinado de alcohol isopropílico para su funcionamiento. Actualmente, han salido al mercado modelos alternativos de contenedores que emplean materiales termoaislantes, como la espuma de polietileno de densidad uniforme, que no requieren de alcohol isopropílico (7).

Una vez que las células han sido cuidadosamente congeladas se pueden almacenar tanto en congeladoras a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}/-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , recomendadas para períodos cortos de tiempo; como en tanques de vapores de nitrógeno ( $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) o de nitrógeno líquido (NL) ( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), recomendado para períodos prolongados de tiempo debido a que a estas temperaturas todos los procesos metabólicos celulares se detienen (42).

### C. Descongelamiento de las muestras

Tan importante como lograr un proceso de congelación óptimo, es establecer un sistema adecuado de descongelamiento. Dicho sistema debe reducir al máximo el estrés producto del cambio extremo de temperatura. Se deberá disponer, además, de todas las condiciones necesarias (físicas, bioquímicas) para que las células puedan restablecerse luego del período de congelación.

Entre los factores a considerar encontramos: i) la temperatura de descongelamiento, que generalmente se establece a 37 °C, ii) el tiempo de descongelamiento, el cual siempre debe ser el menor posible para evitar que la temperatura del crioprotector incremente y ejerza un efecto tóxico sobre las células; y iii) el proceso de dilución (lavado), en el cual se busca diluir al máximo la concentración del crioprotector, a la vez que se le aportan a las células componentes nutricionales importantes para su restablecimiento (7, 40).



**Figura 3.** Parámetros más importantes a controlar durante la criopreservación de células.  
Adaptado de Matthews y col. (40).

### **III.3. Antecedentes**

Diversos estudios han sido realizados en torno a la optimización de métodos de criopreservación en células primarias. En algunos casos, dichos estudios se han centrado en células sanguíneas del sistema inmune como los PBMCs. Entre ellos, los linfocitos han sido los más estudiados. Debido al rol que cumplen estas células en el organismo constituyen modelos importantes para estudios funcionales y de proliferación del sistema inmune (47,48). Además, los linfocitos son considerados plataformas ideales para la producción de anticuerpos (49). No obstante, los estudios en monocitos están cobrando cada vez más importancia al ser precursores de células claves del sistema inmune innato (macrófagos y células dendríticas) (37,50).

Algunos estudios se han centrado en la evaluación de los medios de criopreservación y en el mejoramiento de la calidad y formulación de éstos. Dichos medios en los cuales las células se resuspenden antes de ser criopreservadas deben cumplir con ciertas características y requisitos que permitan una óptima preservación de las muestras. El componente principal de los medios de criopreservación son los agentes crioprotectores. Actualmente, el DMSO es el crioprotector más utilizado en el mercado (42,44).

El 2012, Nazarpour y col. evaluaron el efecto de tres variables relacionadas al medio de criopreservación sobre la viabilidad de los PBMCs luego de ser descongelados. Estas variables fueron: el porcentaje de DMSO, temperatura del medio de criopreservación, y porcentaje de FBS. Dichos PBMCs fueron extraídos de 16 voluntarios sanos. Entre las variables estudiadas, la concentración de DMSO mostró tener un mayor impacto en la sobrevivencia de los PBMCs luego del

descongelamiento. Se evidenció una disminución significativa en la viabilidad celular a una concentración de DMSO mayor a 15% (51).

En líneas generales, siempre se trata de emplear la menor concentración de DMSO en el medio debido a los efectos citotóxicos de este a temperatura ambiente. Sin embargo, Balint y col. demostraron que esto puede depender del tipo de células que se criopreserve. Al probar diferentes protocolos de criopreservación en tres poblaciones celulares (células madre hematopoyéticas pluripotenciales, células progenitoras pluripotenciales y células progenitoras de granulocitos-monocitos), se obtuvo un mayor porcentaje de recuperación al emplear un medio con 10% de DMSO en células madre hematopoyéticas. Mientras que en las otras dos poblaciones celulares, se obtuvo un mayor porcentaje de recuperación cuando se empleó el medio con 5% de DMSO (52).

El 2014, Koryakina y col. probaron 10 diferentes formulaciones para medios de criopreservación en PBMCs obtenidos de un centro de donación de sangre. Sus criterios de aceptación fueron una recuperación del 80%, una viabilidad del 95% y una respuesta apropiada frente a diferentes ligandos de receptores TLR. El medio de criopreservación que mostró mejores resultados frente a estos criterios fue aquel que presentaba una concentración de DMSO del 7% (53). En general, se recomienda emplear un intervalo de DMSO entre 5-10% (7).

La formulación de los medios de criopreservación empleados de manera rutinaria en muchos laboratorios incluye, además del agente crioprotector, un medio de cultivo que contiene suero. Muchos investigadores inclusive emplean solamente suero, principalmente animal, como el FBS junto con el DMSO. Las diferentes proteínas y complementos que componen el suero, y permiten el crecimiento, la



diferenciación y la proliferación celular en muchos cultivos, parecen ayudar a reconstituir las células luego del estrés que experimentan durante el descongelamiento. En muchos casos, los investigadores alegan que el suero animal no sería beneficioso para criopreservar ciertas células; especialmente si estas serán empleadas para terapias celulares y no pueden estar expuestas a productos derivados de animales, tal como el FBS (7,40).

Actualmente se vienen desarrollando una serie de nuevos medios comerciales, para reemplazar al suero dentro de su composición, debido a la variabilidad de dicho componente entre lotes. Esto permitiría asegurar la obtención de mayores resultados reproducibles en los ensayos de criopreservación. (40). El 2009, Clarke y col. evaluaron la efectividad del medio CryoStor<sup>®</sup> (medio comercial libre de suero) para criopreservar células madre de sangre periférica (PBSC). Las células criopreservadas con CryoStor<sup>®</sup> mostraron una recuperación post-descongelamiento significativamente mejor (54).

Algunos investigadores decidieron probar el efecto del uso de sub-fracciones del suero bovino que fueran químicamente estables y seguras, y producidas bajo condiciones de GMP. El 2011, Germann y col. evaluaron la efectividad de dos medios alternativos que contenían albúmina de suero bovino (fracción V) en la criopreservación de PBMCs, obtenidos de 10 donantes voluntarios. Sus resultados post-descongelamiento mostraron que la recuperación de PBMCs obtenida con éstos medios libres de suero fue superior a 83% y la viabilidad mayor a 98%. No obstante, los resultados alcanzados fueron similares a los obtenidos por el medio que contenía suero bovino (55).

Algunos tipos de células son más sensibles a los efectos adversos producidos por el DMSO. En estos casos, el uso del glicerol como agente crioprotector es más conveniente y su uso es casi tan frecuente como el del DMSO. El 2016, von Bomhard y col. probaron cuatro diferentes agentes crioprotectores (DMSO, etilenglicol, propilenglicol, y glicerol) en combinación con dos medios diferentes (K<sup>+</sup>TIP y DMEM) para criopreservar células endoteliales (MHECT-5) empleando dos modelos de criopreservación: la vitrificación y el congelamiento lento controlado (1 °C/minuto). Los mejores resultados arrojados con respecto a la recuperación post-descongelamiento fueron para las células criopreservadas en medio K<sup>+</sup>TIP con DMSO para la vitrificación; y medio DMEM con DMSO para la congelación lenta. Con respecto a la viabilidad (luego de tres días de cultivo post-descongelamiento), los mejores resultados fueron arrojados para las células criopreservadas en medio K<sup>+</sup>TIP con glicerol para la vitrificación; y medio DMEM con propilenglicol para la congelación lenta (56). Por lo que se podría deducir que la efectividad de la criopreservación, va a depender no solo del agente crioprotector sino también de la composición del medio en el que se encuentra.

El 2016, Rogulska y col. buscaron evaluar la efectividad de medios compuestos de  $\alpha$ -MEM con diferentes concentraciones de sucrosa, para criopreservar células del estroma mesenquimal derivados de adipocitos humanos. Los investigadores mostraron que los mejores resultados de recuperación celular se obtuvieron con una concentración de sucrosa de 200mM. Sin embargo, los valores de viabilidad y recuperación celular con estos medios estudiados no fueron mayores al 60%; mientras que los valores obtenidos con un medio control compuesto de 20% FBS y 10% de DMSO fue superior al 80% (57).

El sistema de congelamiento y almacenamiento de células a emplear va a depender mucho de factores como el tipo de células a criopreservar, pero sobre todo el tiempo de preservación deseado. Los equipos para almacenamiento más utilizados son las congeladoras a -70/-80 °C y los tanques de nitrógeno líquido.

En 1999, Galmés y col. demostraron que los niveles de recuperación de dos subpoblaciones de células progenitoras hemotapoyéticas (BFU-E y CFU-GM) obtenidas de 24 pacientes, se vieron afectados por el tiempo de preservación a -80 °C. Luego de 6 meses de almacenamiento, la recuperación de BFU-E fue de 80.5% y de CFU-GM fue de 63.5%. A los 12 meses fue de 43.5% y 50%, respectivamente. A los 24 meses, 0% para ambos. Por lo tanto, los investigadores recomendaron no preservar este tipo de células por más de 6 meses a -80 °C (58).

El 2010, Weinberg y col. evaluaron tres condiciones de almacenamiento y transporte hacia el laboratorio para muestras de PBMCs de donantes sanos y pacientes con VIH: (i) NL/NL, (ii) NL/hielo seco, (iii) -70 °C/hielo seco. La condición (i), almacenamiento y transporte, ambos en NL, mostró los mejores resultados de viabilidad y recuperación celular. Por otro lado; el almacenamiento a -70 °C fue óptimo hasta un periodo de 3 semanas porque pasado este periodo se observó una disminución significativa de la viabilidad y la recuperación. Al final, los investigadores concluyeron que cuando los recursos logísticos sean limitados, almacenar las muestras a -70 °C hasta 3 semanas resulta conveniente (59).

En 1999, Kleeberger y col. realizaron un estudio experimental prospectivo donde se estudiaron PBMCs extraídos de un repositorio de muestras biológicas obtenidas tanto de donantes sanos como de pacientes con VIH seropositivos. Estos PBMCs fueron criopreservados en tanques de NL durante 12 años y los ensayos se

realizaron en 4 centros de investigación de Estados Unidos. Los resultados mostraron que para un vial con una concentración de  $1 \times 10^7$  células, la mediana ( $n = 5222$ ) de la recuperación celular fue por lo menos de 50% y la mediana de la viabilidad fue de por lo menos 90%. Estos valores fueron suficientes para los análisis fenotípicos y funcionales que se realizaron posteriormente. Por lo tanto, los investigadores concluyeron que la criopreservación de PBMCs por hasta 12 años, bajo sus condiciones establecidas, no mostró una tendencia marcada de muerte celular en el tiempo (60).

Otro factor importante a considerar durante la etapa de almacenamiento es el control de una temperatura constante. Las fluctuaciones de temperatura producto de diversas situaciones como la apertura de las congeladoras y/o tanques pueden impactar de manera importante sobre la viabilidad celular. El 2016, Angel y col. estudiaron este fenómeno utilizando un dispositivo mecánico que se componía, entre otros, de un brazo robótico acoplado a un contenedor de NL. Dicho dispositivo simulaba las fluctuaciones de temperatura que pueden ocurrir en lugares de almacenamiento en los cuales se deben extraer muestras en ciertos momentos. Muestras de PBMCs fueron sometidas a 50 ciclos de variación de  $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta alcanzar 350 ciclos. Todos los parámetros estudiados (viabilidad, recuperación y funcionalidad de las células) disminuyeron sus valores conforme aumentaron los ciclos de variación de temperatura (61).

Para la etapa del descongelamiento, de igual modo que para la congelación, es importante optimizar los parámetros involucrados. El 2009, Weinberg y col. evaluaron dos criterios de dilución con el medio de lavado luego de descongelar los crioviales de PBMCs: i) Dilución lenta, donde se añadió 5 mL de medio de lavado gota a gota durante 2 a 3 minutos; y ii) Dilución rápida, donde se añadió los

5 mL de medio de lavado rápidamente. La dilución lenta de PBMCs luego de descongelarse mejoró significativamente la recuperación de células viables (62). Koryakina y col. mostraron que los mejores resultados en términos de viabilidad y recuperación se dieron cuando se descongelaron los PBMCs a 37 °C en baño maría por máximo un minuto, dado que a mayor tiempo el DMSO se vuelve más tóxico para las células (53).

El 2012, Ramachandran y col. evaluaron una serie de factores relacionados al descongelamiento de PBMCs. Sus estudios demostraron que la adición de medio frío a células frías reduce drásticamente la viabilidad. A su vez, demostraron que la adición de medio atemperado a 37 °C, independiente de la velocidad de adición, arroja resultados de viabilidad altos. El mismo investigador y su equipo también estudiaron el efecto del número de lavados y el tiempo de exposición al DMSO sobre las células descongeladas. Ellos concluyeron que realizar dos lavados con medio en lugar de uno incrementaba de manera significativa la viabilidad celular, ya que se diluía en mayor medida la concentración del DMSO en el medio. Con respecto al tiempo de exposición al DMSO, de manera inusual, las células disminuyeron su viabilidad tan sólo en 3.6% luego de mantenerse una hora a 37 °C; además, la funcionalidad de las poblaciones celulares CD4+ y CD8+ no disminuyeron de manera significativa luego de mantenerse 30 minutos a 37 °C cuando se les realizó un análisis por ELISPOT (63).

Los resultados de Ramachandran fueron corroborados el 2017 por Hønge y col., quienes de igual manera demostraron que el lavado de PBMCs con medio atemperado a 37 °C proporciona valores más altos de recuperación y viabilidad frente al lavado con un medio frío a 5 °C. Además, se compararon dos tiempos para la incubación a 37 °C: el primero, el tiempo suficiente hasta observar un

pequeño trozo de hielo en el criovial (minuto y medio), y el segundo de 5 minutos. En ambos tiempos se observaron valores altos y similares, para la viabilidad y recuperación. Adicionalmente, los investigadores determinaron que los medios de lavado que contenían suero (tanto humano como animal) proporcionaban promedios más altos de viabilidad y recuperación celular (64).

Desde hace algunos años se ha empezado a diseñar equipos automatizados para el descongelamiento de las células que buscan reemplazar el uso del Baño María. Dado que este podría suponer algunos riesgos como posibles contaminaciones producto de la calidad de agua que se utilice. El 2015, Stone y col. evaluaron la efectividad de dos sistemas de descongelamiento en muestras de PBMCs criopreservadas: uno empleando el clásico Baño María y el otro empleando el nuevo equipo automatizado ThawStar. El descongelamiento de PBMCs con este último sistema brindó mejores resultados en términos de viabilidad y recuperación celular (65).

## **IV. PARTE EXPERIMENTAL**

**IV.1. Tipo de estudio:** Experimental.

### **IV.2. Variables del Estudio**

- Variables dependientes: Viabilidad celular, Recuperación celular.
- Variables independientes: Tipo de medio, Tiempo de almacenamiento, Tipo de contenedor de congelación.

Ver tabla de operacionalización de variables en el Anexo 1.

### **IV.3. Lugar de estudio**

La toma de sangre de los donantes, y su posterior procesamiento para la obtención y criopreservación de PBMCs, fueron realizados en las instalaciones del Laboratorio de Investigación en Enfermedades Infecciosas (LIEI) ubicado en la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH) – (San Martín de Porres, Lima).

### **IV.4. Materiales y Reactivos**

- Reactivos

- ✓ Alcohol medicinal (Etanol 70°)
- ✓ Medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
- ✓ Suero Bovino Fetal (FBS)
- ✓ Lymphoprep®
- ✓ CryoStor CS10®
- ✓ Alcohol Isopropílico
- ✓ Solución de Krebs-Ringer-Glucosa (KRG) libre de  $\text{Ca}^{+2}$
- ✓ DMSO (Dimetilsulfóxido)
- ✓ Buffer HEPES

- ✓ Colorante azul de tripano

#### - Materiales

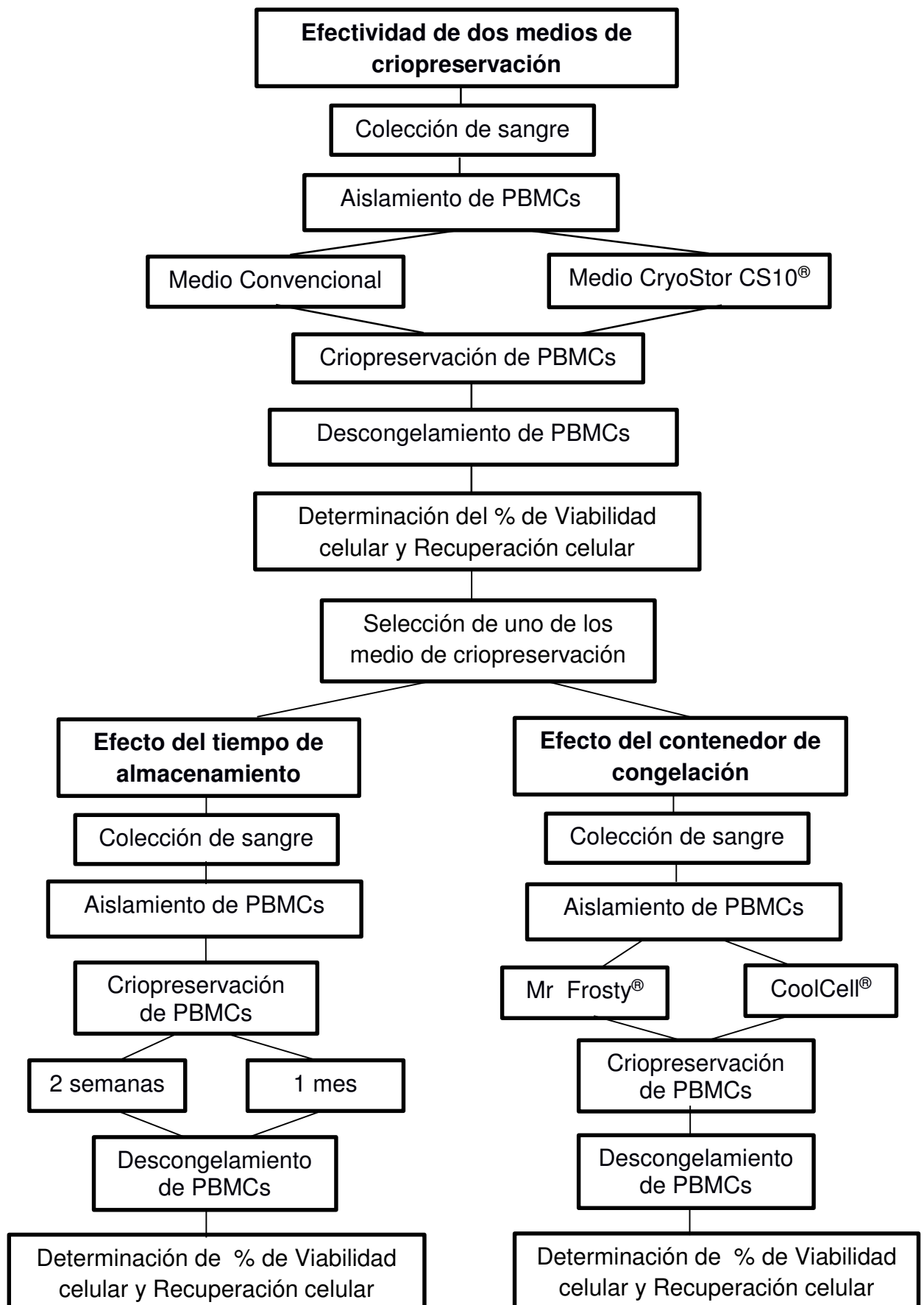
- ✓ Tubos BD Vacutainer® con heparina sódica (tapa verde)
- ✓ Aguja múltiple 21G x 1" (0.8 x 25 mm) BD Vacutainer®
- ✓ Ligadura de látex para extracción de sangre
- ✓ Algodón
- ✓ Tubos cónicos plásticos (10 mL, 15 mL, 50 mL)
- ✓ Tubos para microcentrífuga (0.6 mL, 1.5 mL, 2 mL)
- ✓ Crioviales (1 mL)
- ✓ Pipetas serológicas (5 mL, 10 mL)
- ✓ Pipeteador electrónico
- ✓ Micropipetas
- ✓ Tips (1000 µL, 200 µL, 100 µL, 20 µL)
- ✓ Pipetas de transferencia plásticas (graduadas de 3 mL)
- ✓ Cámara de Neubauer
- ✓ Contenedor de congelación Mr Frosty®
- ✓ Contenedor de congelación CoolCell®

#### - Equipos

- ✓ Cabina de Flujo Laminar (Bioseguridad nivel II, marca LABCONCO®)
- ✓ Centrífuga refrigerada (marca Thermo Scientific)
- ✓ Microscopio invertido (marca OLYMPUS)
- ✓ Equipo de Baño María (marca Shel Lab®)
- ✓ Refrigeradora común (marca Frigidaire®)
- ✓ Congeladora a -80 °C (marca NUAIRE)



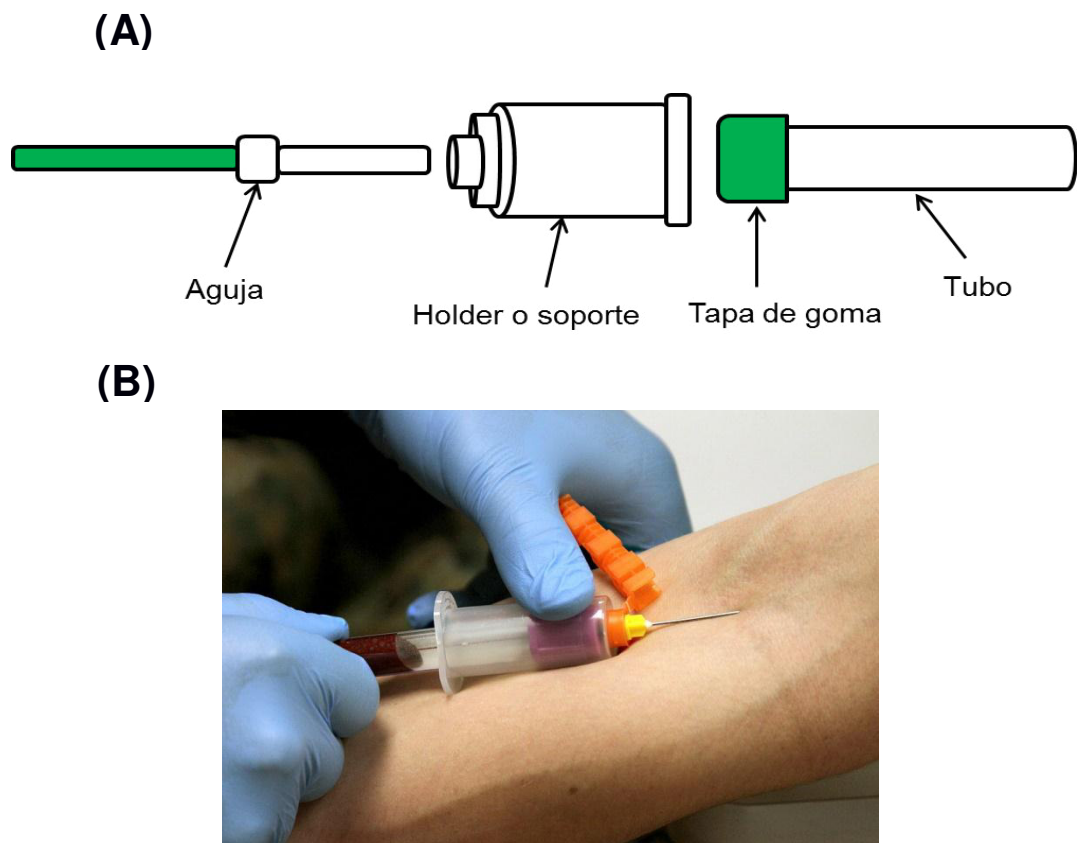
#### IV.5. Flujograma del trabajo experimental



## IV.6. Procedimientos

### IV.6.1. Recolección de muestras

Para los ensayos realizados se recolectaron muestras de sangre de 15 voluntarios en total. Se extrajo alrededor de 60 mL de sangre por voluntario. Para esto se utilizaron 6 tubos BD Vacutainer® de 10 mL de capacidad máxima cada uno, con heparina sódica y sellado al vacío. Se efectuó la extracción de sangre mediante un sistema al vacío (Ver Figura 4).



**Figura 4.** (A) Sistema completo de extracción. (B) Toma de muestra.

La toma de sangre a los donantes se realizó de la siguiente manera:

- A. Se colocó una ligadura algunos centímetros por encima de la zona de punción y se realizó un torniquete alrededor del brazo.
- B. Se localizó la vena en la cual se introducirá la aguja por palpación.

- C. Se conectó la parte posterior de la aguja a un holder o soporte.
- D. Se limpió la zona de punción con un pedazo de algodón humedecido con alcohol, se dejó secar y luego se introdujo la aguja a la vena.
- E. Sin mover la aguja ni el holder de la zona de punción, se introdujo un tubo dentro del holder con el objetivo que la parte posterior de la aguja atravesara la parte central de la tapa de goma del tubo. NOTA: Los tubos, por ser sellados al vacío, funcionan como el émbolo de una jeringa, aspirando la sangre hasta un volumen establecido.
- F. Se esperó a que el tubo terminara de llenarse (cese de la fluctuación de sangre) y se retiró el tubo.
- G. Se invirtió el tubo de 8 a 10 veces para que la sangre se mezclara con el anticoagulante.
- H. Se procedió de la misma manera con los otros 5 tubos y luego se retiró la aguja de la zona de punción.
- I. Se presionó la zona de punción con un algodón.
- J. Se indicó al donante que se quedará en reposo por espacio de algunos minutos antes de que se retire.

Cabe mencionar que se extrajo el volumen mencionado para replicar las características de las muestras a recolectar en el proyecto matriz de INNOVATE PERÚ (Programa del Ministerio de la Producción), en el que se tiene establecido extraer 30 mL de sangre por paciente para ensayos celulares. De este modo, para la presente tesis se tomaron dos alícuotas de 30 mL por donante, para poder comparar los factores descritos en los Objetivos Específicos. Algunos de los voluntarios decidieron participar en más de un ensayo.

La recolección de sangre se realizó en las instalaciones del laboratorio donde se realizaron los ensayos de criopreservación.

Los criterios de inclusión/exclusión establecidos para los donantes fueron los siguientes:

Criterios de inclusión:

- ✓ Personas entre 18 a 35 años de edad.
- ✓ Buen estado de salud

Criterios de exclusión:

- ✓ Fumadores
- ✓ Historial de enfermedades crónicas (Fibrosis quística, cáncer)
- ✓ Historial de tuberculosis
- ✓ Consumo de drogas
- ✓ Historial de alcoholismo
- ✓ Personas que tuvieran o hayan tenido procesos infecciosos recientes (cuadros infecciosos hasta 2 semanas antes de la toma de muestras).

Cabe resaltar, que todos los donantes, previo a la toma de muestra, firmaron un consentimiento informado (ver Anexo 2). En dicho consentimiento, los donantes autorizaban el uso de los PBMCs, obtenidos de su sangre, para ensayos futuros.

#### **IV.6.2. Aislamiento de PBMCs**

Una vez colectadas las muestras de sangre, estas fueron procesadas mediante la técnica de centrifugación por gradiente de densidad. La técnica se basa en la separación de las células sanguíneas en relación a sus densidades, cuando la sangre es centrifugada con un medio de gradiente de densidad (ver esquema de la Figura 5). En nuestro caso, se empleó el medio Lymphoprep® como medio de gradiente ya que presenta una densidad similar a la de los PBMCs (1.077 g/mL). Luego de la centrifugación se obtiene una capa color blanquecino, denominada “buffy coat”, situada en la interfase entre la fracción plasmática y la fracción de Lymphoprep®.

La presente técnica es ampliamente empleada en investigación para el aislamiento de PBMCs (representados principalmente por los linfocitos y monocitos), que luego podrán ser separados por métodos más sofisticados (ej. Empleo de anticuerpos acoplados a perlas magnéticas). Existen diversos protocolos en la literatura científica para el aislamiento de PBMCs que utilizan esta técnica, como el publicado por Reidhammer y col. en 2016 (66); además, representa la técnica más empleada en estudios de criopreservación de PBMCs (51, 53, 55, 64, 65).

Se realiza un conteo celular en cámara de Neubauer para calcular el número total de PBMCs y, además, mediante la adición del colorante azul de tripano (técnica de exclusión por tinción), se logra discriminar entre células vivas y muertas para calcular el porcentaje de viabilidad. Esta técnica, se basa en la impermeabilidad de la membrana plasmática de células vivas a ciertos colorantes debido a sus características químicas, como una carga negativa; por el contrario, la membrana de células muertas, las cuales se encuentran dañadas, no obstruyen el ingreso de

dichos colorantes (67,68). Las células muertas en la presente técnica serán identificadas al microscopio como aquellas que se tiñen de un color azul intenso. Investigaciones anteriores relacionadas a la criopreservación de PBMCs han empleado esta técnica para determinar el porcentaje de viabilidad de las células (51, 55, 59, 60, 62).

Todos los pasos del protocolo de aislamiento de PBMCs que a continuación se describen fueron realizados en cabina de flujo laminar, a excepción de las centrifugaciones refrigeradas y el conteo de células.

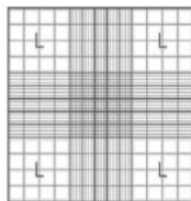
- A. Se repartió el volumen total de sangre en dos tubos cónicos de 50 mL que contenían 15 mL de reactivo Lymphoprep® (de 20 mL a 30 mL de sangre por tubo cónico). Se vertió la sangre de manera lenta y suave por las paredes de los tubos, con la finalidad de formar una capa de sangre por encima de la capa de reactivo.
- B. Los tubos que contenían la bicapa sangre/Lymphoprep® fueron centrifugados a 450 G por 30 minutos a temperatura ambiente.
- C. Cada “buffy coat” fue transferido, con la ayuda de una pipeta de transferencia, a otro tubo cónico estéril de 50 mL por separado. Cada tubo cónico contenía 5 mL de una solución fría (4 °C) de KRG (ver composición y preparación en el Anexo 4).
- D. Con la ayuda de una pipeta serológica, se vertió más solución fría de KRG, a través de las paredes de los tubos, hasta completar un volumen de 50 mL para realizar un lavado de células. Se invirtieron los tubos de dos a tres veces para homogeneizar la mezcla.
- E. Se centrifugó a 300 G por 10 minutos a 4 °C.

- F. Luego de la centrifugación, se descartaron los sobrenadantes por decantación y se agregó 5 mL más de KRG frío. Luego, con la ayuda de una pipeta de transferencia, se homogenizaron las suspensiones celulares, aspirando y expulsando volumen de manera continua y suave (alrededor de cinco a diez veces) con la finalidad de desagregar el pellet celular.
- G. Con la ayuda de una pipeta serológica, se vertió más solución fría de KRG, a través de las paredes de los tubos, hasta completar un volumen de 30 mL para realizar un nuevo lavado.
- H. Se centrifugó a 220 G por 10 minutos a 4 °C.
- I. Se realizó un tercer lavado de PBMCs, por lo que se repitieron los pasos F, G y H.
- J. Se descartaron los sobrenadantes por decantación y luego se resuspendieron los pellets con el volumen remanente. Se midió y registró el volumen de suspensión celular en ambos tubos con la ayuda de una micropipeta. Se mezclaron ambos volúmenes en un solo tubo y con la ayuda de una micropipeta se aspiró y expulsó volumen delicadamente para obtener una suspensión homogénea del total de PBMCs aislados. Se tomó una alícuota de 10  $\mu$ L para realizar el conteo celular en cámara de Neubauer, siguiendo el procedimiento detallado a continuación.

Conteo de células: Se procedió de la siguiente manera:

- Se realizaron las diluciones necesarias a la alícuota de 10  $\mu$ L con el objetivo de obtener un número de células de fácil lectura en el microscopio. Se diluyó con KRG en frío y las diluciones más empleadas fueron 1:25, 1:50 y 1:100.
- Se realizó una dilución final 1:2 con el colorante azul de tripano.

- Se cargó 10 µL de la dilución final en la cámara de Neubauer y se contaron las células presentes, tanto vivas y muertas, en los cuatro cuadrados grandes de las esquinas (L) de la cuadrícula de recuento, utilizando un microscopio invertido.



**Figura 5:** Cuadrícula de recuento de la cámara de Neubauer

- Para determinar el número total de PBMCs, se usa el volumen total de la suspensión celular ( $V_T$ ) registrado en el paso J del presente protocolo. Se empleó la siguiente fórmula:

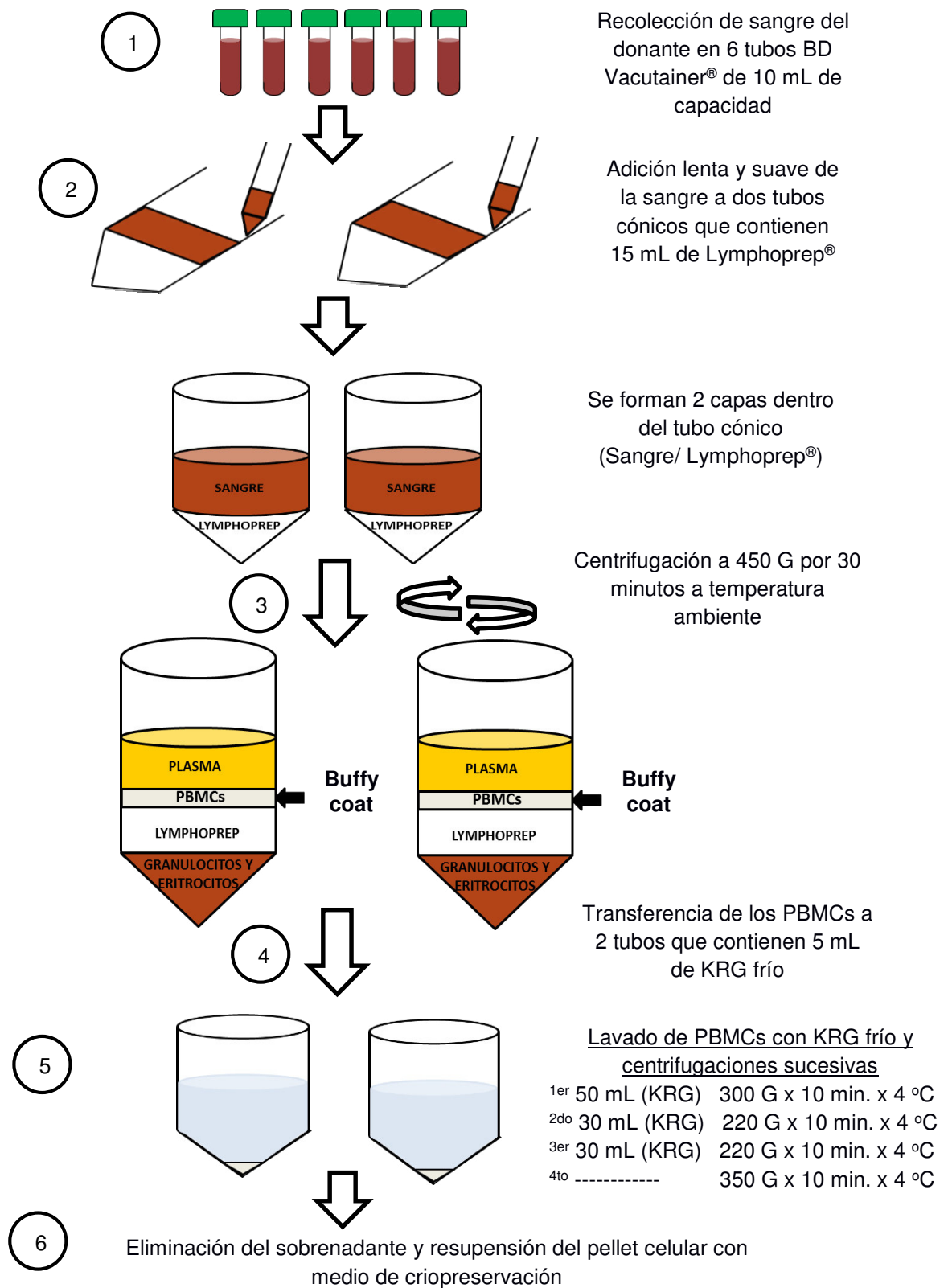
$$\text{PBMCs}_{\text{totales}} = \frac{\text{Nº total de células vivas} \times \text{factor de dilución final} \times 10^4 \times V_T (\text{mL})}{4}$$

- La viabilidad de PBMCs fue calculada mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{\text{Nº de células vivas}}{\text{Nº de células vivas} + \text{muertas}} \times 100$$

- K. Se transfirió la mitad de volumen de la suspensión total hacia el tubo que había quedado vacío, con el propósito de tener el mismo número de células en ambos tubos.
- L. Se llevaron los tubos a centrifugar a 350 G por 10 minutos a 4 °C.
- M. Con la ayuda de una micropipeta, se descartó el máximo volumen posible de sobrenadante hasta dejar un pequeño menisco de líquido por encima del pellet en ambos tubos.
- N. Finalmente, a las suspensiones de ambos tubos se les adicionó el medio de criopreservación requerido según el protocolo de cada ensayo de criopreservación. Los protocolos se describen más adelante.





**Figura 6.** Esquema de proceso de separación de PBMCs de la sangre

### IV.6.3 Criopreservación de PBMCs

Luego de aislar los PBMCs, estos fueron resuspendidos en un medio de criopreservación adecuado y bajo condiciones específicas para cada ensayo realizado. Los ensayos son descritos a continuación, en orden secuencial:

#### IV.6.3.1. Ensayo 1: Evaluación de la efectividad del medio de criopreservación

En este ensayo se evaluó la efectividad de dos medios de criopreservación: uno denominado “**convencional**” compuesto de 90% de FBS y de 10% de DMSO, ampliamente reconocido y de preparación rutinaria en laboratorios que criopreservan células de origen humano; y el medio comercial **CryoStor CS10®**, distribuido por STEMCELL™ technologies, cuyas características principales son: i) presentar una formulación libre de suero y componentes animales que pudieran generar reactividad en ciertas poblaciones celulares, ii) presentar una concentración de DMSO del 10% y iii) ser fabricado bajo condiciones de GMP que permite garantizar una mayor reproducibilidad de resultados. Más información sobre el CryoStor CS10® y la preparación del medio convencional se puede ver en los Anexos 3 y 4, respectivamente.

La efectividad se evaluó, en este ensayo en los ensayos sucesivos, en términos de viabilidad y recuperación celular. En base a estudios previos (59), se estableció los siguientes criterios para considerar como efectivo un medio de criopreservación:

- i) % de viabilidad celular  $\geq 85\%$
- ii) % de recuperación celular  $\geq 50\%$

Para el ensayo de criopreservación se procedió de la siguiente manera:

- A. A una de las alícuotas de PBMCs (tubo de 50 mL) proveniente del protocolo anterior de Aislamiento, se adicionaron 500  $\mu$ L de medio convencional (el

medio se encontraba almacenado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , se descongeló y se mantuvo entre  $4\text{-}8\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso). Se homogenizó la suspensión, aspirando y expulsando volumen muy lentamente con la ayuda de una micropipeta. La suspensión fue transferida del tubo de 50 mL a un criovial. Este paso se realiza de manera rápida (no más de tres minutos) para evitar el estrés celular. Dicho criovial se colocó inmediatamente en un contenedor Mr Frosty® y se llevó a la refrigeradora mientras se procesaba la siguiente alícuota. **NOTA:** El contenedor Mr Frosty®, previo al ensayo, se llena de alcohol isopropílico y se mantiene entre  $4\text{-}8\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta ser usado.

- B. A la alícuota de PBMCs restante, se adicionaron 500  $\mu\text{L}$  de CryoStor CS10®. Se homogenizó la suspensión, aspirando y expulsando volumen muy lentamente con la ayuda de una micropipeta (el medio se empleó en frío, tal cual se encontraba almacenado entre  $4\text{-}8\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). La suspensión fue transferida a un criovial; y, tal como en el paso anterior, esto no debe tomar más de 3 minutos. Por último, este 2do criovial se llevó al Mr Frosty® que contenía el 1er criovial y se dejó en la refrigeradora por 20 minutos.
- C. Pasado el período de 20 minutos, se llevó el Mr Frosty® a la congeladora a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  para ser almacenado toda la noche (“overnight”).
- D. Al día siguiente, los crioviales fueron sacados del Mr Frosty® y colocados en una caja de almacenamiento (“criobox”) para ser almacenados a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 2 semanas.

La efectividad de los medios fue un factor determinante para elegir cuál sería el medio más adecuado a emplear en los ensayos sucesivos; sin embargo, otros criterios como la accesibilidad y costo del producto en el mercado también fueron tomados en cuenta para discernir en la elección de uno de ellos.

#### **IV.6.3.2. Ensayo 2: Efecto del tiempo de almacenamiento sobre la efectividad de la criopreservación**

En este ensayo se evaluó como el aumento del tiempo de almacenamiento influyó en la efectividad del método de criopreservación que emplea el medio convencional (seleccionado como el más adecuado). Para esto, se compararon los porcentajes de viabilidad y de recuperación celular obtenidos al criopreservar PBMCs en una congeladora a -80 °C durante dos semanas, tiempo usualmente usado en los laboratorios (64), frente a un mes. Existen escasos estudios sobre la evaluación de períodos mayores a dos semanas para criopreservar PBMCs a - 80 °C. Un período de almacenamiento más prolongado permite la posibilidad de una mayor recolección de muestras, reduciendo los números y costos de traslado. Se procedió de la siguiente manera:

- A. A una de las alícuotas de PBMCs (tubo de 50 mL) proveniente del protocolo anterior de Aislamiento, se adicionaron 500 µL del medio convencional (el medio se encontraba almacenado a -20 °C, se descongeló y se mantuvo entre 4-8 °C hasta su uso). Se homogenizó la suspensión, aspirando y expulsando volumen muy lentamente con la ayuda de una micropipeta. La suspensión fue transferida a un criovial. Este paso se realiza de manera rápida (no más de tres minutos) para evitar el estrés celular. Dicho criovial se colocó inmediatamente en un contenedor Mr Frosty® y se llevó a la refrigeradora mientras se procesaba la siguiente alícuota. **NOTA:** El contenedor Mr Frosty®, previo al ensayo, se llena de alcohol isopropílico y se mantiene entre 4-8 °C hasta ser usado.

- B. Se procesó el alícuota restante de manera idéntica a la primera. Por último, el criovial conteniendo la alícuota se llevó al Mr Frosty®, que ya tenía el 1er criovial y se dejó en la refrigeradora por 20 minutos.
- C. Pasado el período de 20 minutos, se llevó el Mr Frosty® a la congeladora (-80 °C) para ser almacenado toda la noche (“overnight”).
- D. Al día siguiente, los crioviales fueron sacados del Mr Frosty® y colocados en una caja de almacenamiento (“criobox”) para ser almacenados a -80 °C. Un criovial se mantuvo almacenado en la congeladora durante 2 semanas antes de su descongelamiento, y el otro criovial durante un mes.

#### **IV.6.3.3. Ensayo 3: Efecto del tipo de contenedor de congelación sobre la efectividad de la criopreservación**

En este ensayo se evaluó como el tipo de contenedor de congelación influyó en la efectividad del método de criopreservación que emplea el medio convencional, (seleccionado como el más adecuado). Para esto, se compararon los porcentajes de viabilidad y de recuperación celular obtenidos al criopreservar PBMCs con dos tipos diferentes de contenedor. Uno de estos contenedores es el denominado **Mr Frosty®**, de amplio uso a nivel internacional, el cual forma parte de los productos Nalgene® producidos por Thermo Fischer Scientific y se compone de un recipiente plástico circular en el cual se vierte un volumen de alcohol isopropílico en su base interna, antes de su uso, para que se produzca una disminución gradual y controlada de la temperatura; y el segundo denominado **CoolCell®** (ver descripción detallada en el Anexo 3), producido por Biocision®, de aparición más reciente en el mercado, el cual se compone de una espuma de polietileno de densidad uniforme y de un anillo de aleación de metal en la parte interna que asegura una disminución uniforme y controlada de la temperatura en toda el área interior del contenedor.

Además, no requiere de isopropanol para su funcionamiento. Se procedió de la siguiente manera:

- A. A una de las alícuotas de PBMCs (tubo de 50 mL) proveniente del protocolo anterior de Aislamiento, se adicionaron 500  $\mu$ L de medio convencional (el medio se encontraba almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ , se descongeló y se mantuvo entre  $4-8^{\circ}\text{C}$  hasta su uso). Se homogenizó la suspensión, aspirando y expulsando volumen muy lentamente con la ayuda de una micropipeta. La suspensión fue transferida a un criovial. Este paso se realiza de manera rápida (no más de tres minutos) para evitar el estrés celular. Dicho criovial se colocó inmediatamente en un contenedor Mr Frosty<sup>®</sup> y se llevó a la refrigeradora mientras se procesaba la siguiente alícuota. **NOTA:** El contenedor Mr Frosty<sup>®</sup>, previo al ensayo, se llena de alcohol isopropílico y se mantiene entre  $4-8^{\circ}\text{C}$  hasta ser usado.
- B. Se procesó la siguiente alícuota de forma idéntica al paso A, solo hasta su transferencia al criovial. Dicho criovial se colocó en un contenedor CoolCell<sup>®</sup> y este se llevó a la refrigeradora. **NOTA:** El CoolCell<sup>®</sup> se mantuvo a una temperatura entre  $4-8^{\circ}\text{C}$  hasta antes de su uso.
- C. Ambos contenedores (Mr Frosty<sup>®</sup> y CoolCell<sup>®</sup>) se mantuvieron en la refrigeradora por 20 minutos.
- D. Pasado los 20 minutos, ambos contenedores fueron almacenados en la congeladora a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche (“overnight”).
- E. Al día siguiente, los crioviales fueron sacados de ambos contenedores y colocados en una caja de almacenamiento (“criobox”) para ser almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante 2 semanas.

#### **IV.6.4. Descongelamiento de PBMCs**

Una vez cumplido el tiempo de criopreservación establecido en los ensayos, se procedió al descongelamiento de los crioviales conteniendo los PBMCs.

- A. Los crioviales fueron rápidamente llevados del congelador a -80 °C a un Baño María, previamente atemperado a 37 °C.
- B. Manualmente, los crioviales fueron movidos de forma pendular y constante para facilitar su descongelamiento. Y para determinar si la suspensión se había descongelado, se monitorizaron los crioviales al primer minuto, luego cada 20 segundos, sin exceder los dos minutos.
- C. Una vez que se observó solo un pequeño trozo de hielo (alrededor del 20% del volumen de la suspensión), se llevaron inmediatamente los crioviales a la cabina de flujo laminar.
- D. Se adicionó gota a gota y lentamente una solución de lavado hasta enrasar el criovial (ver composición de la solución en el Anexo 2). Luego se homogenizó la suspensión y se transfirió a un tubo cónico estéril de 50 mL.
- E. Se continuó adicionando gota a gota la solución de lavado hasta completar 5 mL.
- F. Se completó el volumen de manera continua hasta alcanzar los 25 mL. Cada cierto tiempo, se tuvo que agitar el tubo de manera circular para asegurar la homogenización.
- G. Se centrifugó a 350 G por 10 minutos a temperatura ambiente.
- H. Luego de la centrifugación, se descartó el sobrenadante con la ayuda de una pipeta serológica al inicio y, luego, cuando el volumen se vuelve alrededor

de 3 a 5 mL, con la ayuda de una micropipeta. Esto con el objetivo de remover la mayor cantidad de sobrenadante posible.

- I. El pellet celular fue resuspendido ya sea empleando medio de cultivo, si se decidió sembrar las células, o con una solución tampón isotónica (como KRG o DPBS) si sólo se procedió al conteo celular. Finalmente, se midió y registró el volumen total de la suspensión con la ayuda de una micropipeta, para determinar luego el número de PBMCs post-descongelamiento.
- J. Para el conteo celular en cámara de Neubauer, se tomó una alícuota de 10 µL de la suspensión y se procedió bajo las condiciones ya descritas en el protocolo de Aislamiento de PBMCs.
- K. El porcentaje de recuperación celular fue determinado en cada uno de los crioviales descongelados usando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{Nº de PBMCs totales post-criopreservación} \times 100}{\text{Nº de PBMCs totales (antes de la criopreservación)}}$$

- I. De igual manera, la viabilidad de PBMCs fue calculada mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{\text{Nº de células vivas}}{\text{Nº de células vivas + muertas}} \times 100$$

#### IV.6.5. Análisis Estadístico

Se aplicó el test no paramétrico de Mann-Whitney para determinar diferencias significativas entre las diferentes variables a comparar en cada ensayo. Se empleó el software estadístico GraphPad Prism5® para realizar dicha prueba. Los valores



de tendencia central (mediana, mínimo y máximo valor) así como los diagramas de dispersión (Scatter-Plot) derivados de los resultados de recuperación y viabilidad celular fueron obtenidos por dicho software.

## V. RESULTADOS

### V.1. Efectividad del medio de criopreservación: Medio convencional vs. CryoStor CS10®

En la siguiente tabla, se muestran los valores de número total, viabilidad (%) y recuperación celular (%) de PBMCs, obtenidos de seis voluntarios, que permitieron evaluar la efectividad de dos medios de criopreservación.

**Tabla 1.** Viabilidad (%) y recuperación celular (%) de PBMCs criopreservados con medio convencional y con CryoStor CS10®.

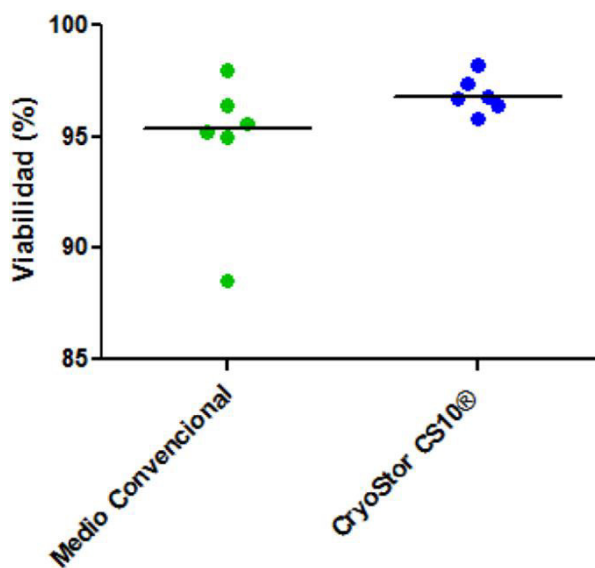
Donantes	Aislamiento de PBMCs a partir de 60 mL de sangre		Descongelamiento de los PBMCs criopreservados			
			Viabilidad de PBMCs (%)		Recuperación de PBMCs (%)	
	Número total de PBMCs	Viabilidad de PBMCs (%)	Medio Convencional	Medio CryoStor CS10®	Medio Convencional	Medio CryoStor CS10®
MS	51 463 000	99.30%	98.00%	97.40%	80.60%	84.80%
CR	63 327 000	100%	95.20%	98.20%	92.50%	67.40%
AV	64 575 000	98.70%	95.00%	96.70%	55.40%	91.50%
SQ	69 955 000	99.50%	95.60%	96.40%	71.00%	64.90%
WS	83 545 000	98.60%	96.40%	96.80%	100.00%	100.00%
FA	89 906 250	95.50%	88.50%	95.80%	79.00%	74.40%

Con respecto a la viabilidad, los menores porcentajes obtenidos fueron 88.5% y 95.8% para el medio convencional y el CryoStor CS10®, respectivamente. Por otro lado, los mayores porcentajes fueron 98% y 98.2% para el medio convencional y el

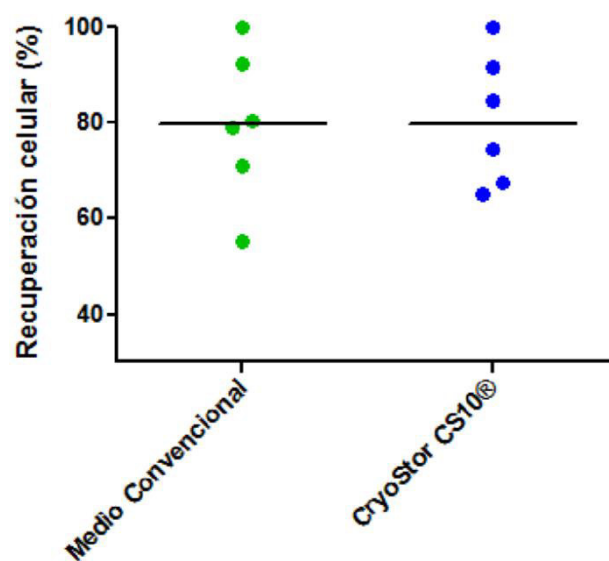
CryoStor CS10<sup>®</sup>, respectivamente. La mediana de viabilidad obtenida con el medio CryoStor CS10<sup>®</sup> (96.75%) fue ligeramente superior a la mediana obtenida con del medio convencional (95.4%).

Con respecto a la recuperación celular, los menores porcentajes obtenidos fueron 55.4% y 64.9% para el medio convencional y el CryoStor CS10<sup>®</sup>, respectivamente. Por otro lado, el mayor porcentaje fue de 100% para ambos medios. La mediana de recuperación obtenida con el medio convencional (79.8%) fue ligeramente superior a la mediana obtenida con el CryoStor CS10<sup>®</sup> (79.6%).

No hubo una diferencia significativa entre los valores de viabilidad y de recuperación celular obtenidos con cada medio de criopreservación ( $p > 0.05$ , test de Mann-Whitney).



**Figura 7.** Viabilidad de PBMCs (n=6 donantes) al emplear dos medios de criopreservación:  
i) Medio convencional: 90% de FBS + 10% de DMSO y ii) CryoStor CS10<sup>®</sup>: contiene 10% de DMSO. Medianas representadas por una línea horizontal (medio convencional: 95.4%, CryoStor CS10<sup>®</sup>: 96.75%).



**Figura 8.** Recuperación de PBMCs (n= 6 donantes) al emplear dos medios de criopreservación: i) Medio convencional: 90% de FBS + 10% de DMSO y ii) CryoStor CS10®: contiene 10% de DMSO. Medianas representadas por una línea horizontal (medio convencional: 79.8%, CryoStor CS10®: 79.6%).

Al determinar mediante los porcentajes de viabilidad y de recuperación celular que ambos medios de criopreservación son efectivos y que no existe una diferencia significativa entre ambos; se decidió optar por el medio cuyo precio o costo de preparación fuera más asequible. Por esto, se optó por el medio convencional, cuyo costo por muestra fue de 0.70 USD mientras que el del CryoStor CS10® fue de 1.92 USD por muestra.

## V.2. Efecto el tiempo de almacenamiento: Dos semanas vs Un mes

En la siguiente tabla, se muestran los valores de número total, viabilidad celular (%) y recuperación celular (%) de PBMCs, obtenidos de seis voluntarios, que permitieron evaluar el efecto de dos tiempos de almacenamiento sobre la efectividad del método de criopreservación que emplea el medio convencional.

**Tabla 2.** Viabilidad (%) y recuperación celular (%) de PBMCs criopreservados durante dos semanas y un mes.

Donantes	Aislamiento de PBMCs a partir de 60 mL de sangre		Descongelamiento de los PBMCs criopreservados			
			Viabilidad de PBMCs (%)		Recuperación de PBMCs (%)	
	Número total de PBMCs	Viabilidad de PBMCs (%)	Dos semanas	Un mes	Dos semanas	Un mes
AR	65 160 000	98.1%	96.2%	92%	96.5%	87.5%
CC	57 420 000	99.3%	92.6%	92.1%	63.6%	56.6%
SQ	85 143 750	100%	94.5%	94.3%	60.4%	44.4%
JC	64 738 750	98.8%	93.9%	90%	42.5%	47.3%
CR	62 617 500	94%	90.2%	94.5%	62.9%	51.9%
FA	85 950 000	97.1%	89.5%	92%	54.8%	80.3%

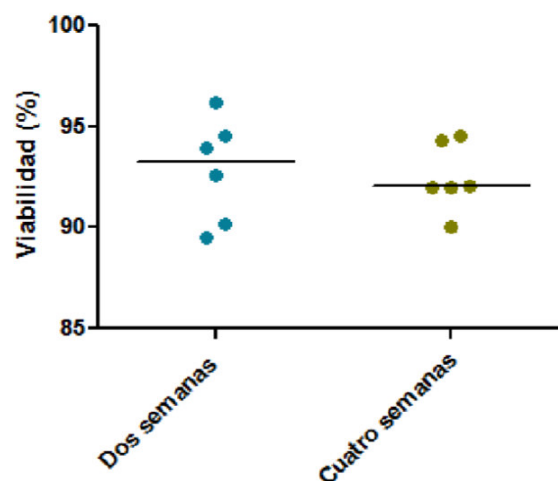
Con respecto a la viabilidad, los menores porcentajes obtenidos fueron 89.5% y 90% para dos semanas y un mes de almacenamiento, respectivamente. Por otro lado, los mayores porcentajes fueron 96.2% y 94.5% para dos semanas y un mes de almacenamiento, respectivamente.

La mediana de viabilidad obtenida en dos semanas de almacenamiento (93.25%) fue ligeramente superior a la mediana obtenida en un mes (92.05%).

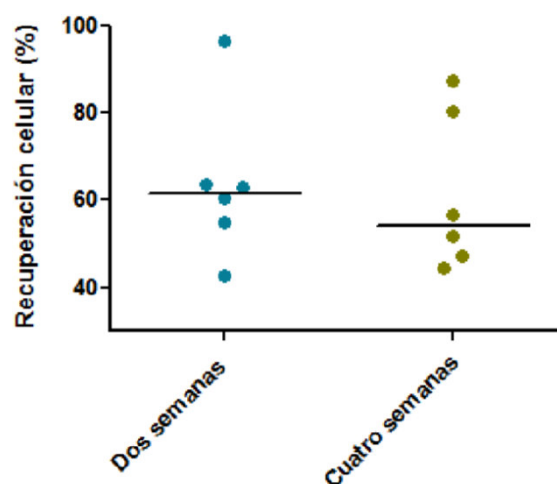
Con respecto a la recuperación celular, los menores porcentajes obtenidos fueron 42.5% y 44.4% para dos semanas y un mes de almacenamiento, respectivamente. Por otro lado, los mayores porcentajes fueron 96.5% y 87.5% para dos semanas y un mes de almacenamiento, respectivamente.

La mediana de recuperación obtenida en dos semanas de almacenamiento (61.65%) fue ligeramente superior a la mediana obtenida en un mes (54.25%).

No existió una diferencia significativa entre los valores de recuperación y viabilidad celular obtenidos con cada tiempo de almacenamiento ( $p > 0.05$ , test de Mann-Whitney).



**Figura 9.** Efecto del tiempo de almacenamiento (Dos semanas o Un mes) sobre la viabilidad de PBMCs (n=6 donantes), criopreservados con medio convencional. Medianas representadas por una línea horizontal (dos meses: 93.25%, un mes: 92.05%).



**Figura 10.** Efecto del tiempo de almacenamiento (Dos semanas o Un mes) sobre la recuperación de PBMCs (n=6 donantes), criopreservados con medio convencional. Medianas representadas por una línea horizontal (dos semanas: 61.65%, un mes: 54.25%).

### V.3. Efecto del tipo de contenedor de congelación: Mr.Frosty® vs CoolCell®

En la siguiente tabla, se muestran los valores de número total, viabilidad celular (%) y recuperación celular (%) de PBMCs, obtenidos de seis voluntarios, que permitieron evaluar el efecto de dos tipos de contenedor de congelación sobre la efectividad del método de criopreservación que emplea el medio convencional.

**Tabla 3.** Viabilidad (%) y recuperación celular (%) de PBMCs criopreservados empleando un contenedor Mr Frosty® y un contenedor CoolCell®.

Donantes	Aislamiento de PBMCs a partir de 60 mL de sangre		Descongelamiento de los PBMCs criopreservados			
			Viabilidad de PBMCs (%)		Recuperación de PBMCs (%)	
	Número total de PBMCs	Viabilidad de PBMCs (%)	Mr Frosty®	CoolCell®	Mr Frosty®	CoolCell®
ER	54 178 000	99.4%	88.6%	93.1%	85.4%	87.5%
DC	98 437 000	99.1%	90.1%	95.8%	100.0%	100.0%
SQ	67 400 000	98.2%	92.5%	96.5%	43.6%	57.0%
GS	70 875 000	98.1%	92.5%	95.2%	59.3%	67.3%
HH	76 735 000	98%	96.0%	98.1%	53.7%	75.5%
JM	70 720 000	96.8%	94.7%	94.5%	65.5%	68.3%

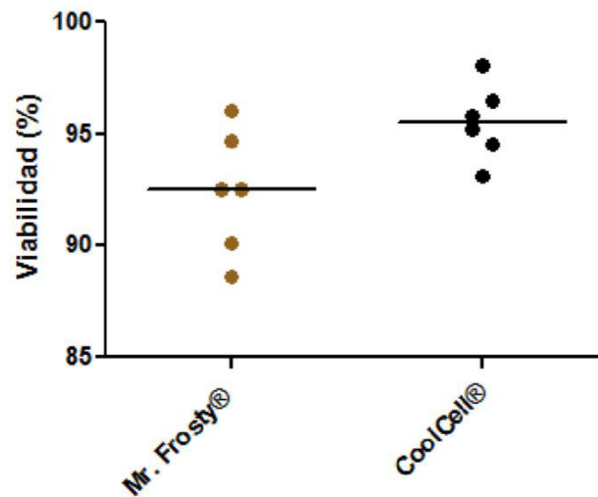
Con respecto a la viabilidad, los menores porcentajes obtenidos fueron 88.6% y 93.1% para el Mr Frosty® y el CoolCell®, respectivamente. Por otro lado, los mayores porcentajes fueron 96% y 98.1% para el Mr Frosty® y el CoolCell®, respectivamente.

La mediana de viabilidad obtenida con el CoolCell® (95.5%) fue ligeramente superior a la mediana obtenida con el Mr Frosty® (92.5%).

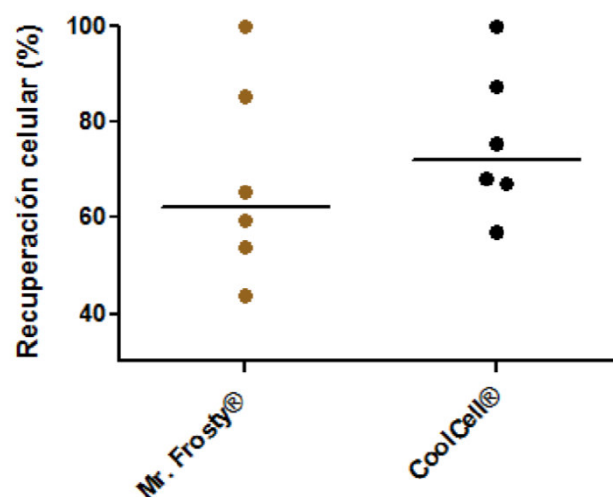
Con respecto a recuperación celular, los menores porcentajes obtenidos fueron 43.6% y 57% para el Mr Frosty® y el CoolCell®, respectivamente. Por otro lado, el mayor porcentaje fue de 100% para ambos contenedores.

La mediana de recuperación obtenida con el CoolCell® (71.9%) fue ligeramente superior a la mediana obtenida con el Mr Frosty® (62.4%).

No existió una diferencia significativa entre los valores de recuperación y viabilidad celular obtenidos con cada contenedor de congelación ( $p>0.05$ , test de Mann-Whitney).



**Figura 11.** Efecto del contenedor de congelación (Mr Frosty® o Cool Cell®) sobre la viabilidad de PBMCs (n=6 donantes), criopreservados con medio convencional. Medianas representadas por una línea horizontal (Mr Frosty®: 92.5%, CoolCell®: 95.5%).



**Figura 12.** Efecto del contenedor de congelación (Mr Frosty® o Cool Cell®) sobre la recuperación de PBMCs (n=6 donantes) criopreservados, con medio convencional. Medianas representadas por una línea horizontal (Mr Frosty®: 62.4%, CoolCell®: 71.9%).



## VI. DISCUSIÓN

El presente trabajo de investigación buscó evaluar distintos parámetros involucrados en el proceso de criopreservación de PBMCs, a fin de implementar un sistema óptimo de criopreservación bajo las condiciones del laboratorio donde se desea realizar.

Se evaluó la eficacia de dos medios de criopreservación: i) un medio convencional compuesto de FBS al 90% y DMSO al 10%, el cual es bastante empleado en ensayos de rutina; y ii) un medio comercial pre-formulado denominado CryoStor CS10<sup>®</sup>, distribuido en el mercado nacional por proveedores como Sigma-Aldrich y Fischer Scientific. El CryoStor CS10<sup>®</sup> presenta características atractivas al investigador como: ser libre de proteína animal lo cual disminuye al máximo el riesgo de reactividad de células, en especial aquellas que pertenecen al sistema inmune, y ser fabricado bajo los estándares de las GMP. Dicho medio ha sido reportado en varias ocasiones en la literatura científica, como un medio que promueve un alto rendimiento y viabilidad celular, tanto en líneas celulares como las N2a y las Caco-2 (69), como en células primarias como las células madre CD34+ (54, 70). Cabe resaltar que en ambos casos, los resultados de recuperación celular obtenidos con CryoStor CS10<sup>®</sup> fueron mayores al compararlos con medios clásicos. En el presente estudio, los porcentajes de viabilidad y recuperación celular hallados son bastante similares (diferencia de medianas: 1.35% y 0.75% respectivamente) para ambos medios estudiados.

Si bien es cierto nuestros resultados hallados difieren de los resultados encontrados en el estudio con células CD34+, debemos recordar que, a pesar de tratarse de células primarias sanguíneas, no se tratan de la misma población celular; además,

las condiciones de almacenamiento y los medios empleados son distintos a los empleados en nuestro estudio.

Si bien ambos medios de criopreservación han proporcionado valores favorables de viabilidad y recuperación celular, el medio convencional ofrece una ventaja económica y logística, ya que las sustancias que la componen son más económicas y más accesibles en el mercado que los medios comerciales. Por este motivo se decidió emplear el medio convencional para evaluar otros factores que permitirían optimizar un sistema de criopreservación.

Se evaluó el efecto del tiempo de almacenamiento, en relación a la viabilidad y recuperación celular, al conservar los crioviales en una congeladora a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Se optó por almacenar a esta temperatura, debido a que muchos trabajos de campo para investigación clínica y biomédica se realizan en zonas remotas del país donde la ausencia de vías de transporte, sobretudo terrestre, como por ejemplo en la selva peruana, hace casi imposible el acceso a NL ( $-196^{\circ}\text{C}$ ). Con este ensayo, también se buscaba evaluar qué tanto la efectividad del medio convencional disminuía con el tiempo. Para ello, se evaluaron dos tiempos de almacenamiento: dos semanas (el período de tiempo más empleado cuando se almacenan muestras a  $-80^{\circ}\text{C}$ ) y un mes. Al mes, en ambos parámetros de evaluación (viabilidad y recuperación celular) hubo una disminución de los porcentajes respecto a los resultados post-descongelamiento a las dos semanas. No obstante, los valores de los porcentajes de viabilidad y recuperación celular luego de un mes se mantuvieron óptimos, con una mediana de 92.05% y 54.25% respectivamente. Estos resultados podrían corroborar lo postulado por Weinberg y col. en 2009, quienes determinaron que hasta tres semanas de almacenamiento a  $-70^{\circ}\text{C}$  la viabilidad y recuperación celular de PBMCs descongelados no se veían afectadas (62). Los valores favorables de

viabilidad y recuperación celular hallados, luego de un mes de criopreservar PBMCs, suponen una gran ventaja para los estudios de campo; ya que un período de almacenamiento más prolongado posibilita una mayor recolección de muestras, reduciendo los transportes frecuentes y, por ende, los costos de envío. En futuros ensayos, se tendrá que determinar cuál es el tiempo de almacenamiento límite bajo las mismas condiciones en la cual la integridad celular no se vea afectada drásticamente.

El análisis de la efectividad de los contenedores de congelación resulta crítico debido a la importancia de la velocidad controlada de congelación para la supervivencia celular y debido a que, en muchos casos, los congeladores de velocidad controlada representan un costo muy alto para los laboratorios. La mayoría de estos emplean contenedores de congelación portátiles. Siendo el Mr Frosty® el contenedor más utilizado en el mercado y con buenos resultados, probados en distintos sistemas de criopreservación. Entre los estudios publicados sobre su eficacia destaca el de Halmot y col. del 2015, donde evaluaron varios parámetros relacionados a la obtención y preservación de PBMCs. Los valores de viabilidad y recuperación celular obtenidos con el Mr Frosty® resultaron similares a los obtenidos con el congelador de velocidad controlada, este último considerado el mejor método para controlar la velocidad de congelación (71). Sin embargo, el uso del Mr Frosty® presenta la desventaja de requerir un abastecimiento continuo de isopropanol en el laboratorio, ya que este se va evaporando e hidratando gradualmente con el uso continuo del contenedor. En el presente estudio, se comparó la efectividad de dos contenedores: el clásico Mr Frosty® y un modelo relativamente nuevo en el mercado, el CoolCell® (de Biocision®) el cual no requiere de isopropanol debido a su tecnología de fabricación. Los resultados hallados en el

presente estudio muestran un porcentaje de recuperación y viabilidad celular mayor en aquellas muestras en las cuales se usó el CoolCell®.

Ensayos sobre la efectividad del CoolCell® han sido reportados anteriormente. En el 2012, Yokoyama y col. realizaron un piloto (n=3, células madre de embrión humano) en el cual evaluaron el porcentaje de células muertas post-descongelamiento al emplear tres métodos de congelación gradual (uno de ellos el CoolCell® y otros dos métodos basados en espuma de poliestireno y papel toalla, respectivamente). La proporción de células muertas fue menor con el CoolCell® (7% menos comparado a los otros sistemas) (72). A la potencial efectividad superior del CoolCell® frente al Mr Frosty® se debe sumar una ventaja económica y logística, ya que no requiere de la compra de alcohol isopropílico, sustancia química volátil e inflamable que muchas veces resulta complicado transportar.

Si bien es cierto, los resultados obtenidos nos ilustran la tendencia positiva de una condición frente a otra, dentro de los parámetros evaluados, se requieren de nuevos ensayos en los cuales el número de muestra sea mayor, para que los resultados obtenidos aquí sean validados y adquieran mayor robustez.

Finalmente, luego de evaluar los factores que influyen en la criopreservación de PBMCs, se debe proseguir con el estudio de la funcionalidad celular post-criopreservación para asegurarse de que las células mantengan sus características fisiológicas e inmunológicas originales, esto es, antes de haber sido sometidas a temperaturas muy bajas asociadas a la criopreservación.

## VII. CONCLUSIONES

- 1 Ambos medios de criopreservación estudiados demostraron una buena efectividad, al obtenerse resultados similares. Las medianas de viabilidad y recuperación celular para el medio convencional fueron de 95.4% y 79.8%, y las medianas para el CryoStor CS10<sup>®</sup> fueron de 96.75% y 79.6%.
- 2 Los porcentajes de viabilidad y recuperación celular disminuyeron al almacenar los PBMCs durante un mes con respecto a las dos semanas (1.2% menos para la viabilidad y 7.4% menos para la recuperación celular). Sin embargo; los valores obtenidos al mes se consideran efectivos, con porcentajes de 92.05% para la viabilidad y 54.25% para la recuperación celular.
- 3 El contenedor CoolCell<sup>®</sup> empleado para el congelamiento gradual de los PBMCs fue más efectivo que el Mr Frosty<sup>®</sup>, al obtenerse medianas de viabilidad y recuperación celular de 95.5% y 71.9% con el CoolCell<sup>®</sup>, frente a medianas de viabilidad y recuperación celular de 92.5% y 62.4% para el Mr Frosty<sup>®</sup>.

## **VIII. RECOMENDACIONES**

Con respecto a lo expuesto en este trabajo y para los intereses del equipo de investigación, en el futuro sería recomendable:

- ✓ Realizar nuevos ensayos bajos las mismas condiciones de optimización con un tamaño mayor de muestra para validar los resultados probados en este estudio.
- ✓ Realizar estudios piloto de criopreservación de PBMCs en las regiones donde se requieran tomar las muestras biológicas para evaluar el efecto de las condiciones climáticas y socio-ambientales del lugar sobre el procesamiento, almacenamiento y transporte de células criopreservadas.
- ✓ Evaluar el impacto de otros factores relacionados a la criopreservación sobre la recuperación celular, como aquellos involucrados en la etapa de descongelamiento.
- ✓ Realizar capacitaciones al nuevo personal que se integre al equipo de investigación en lo que concierne al manejo de cultivos celulares y técnicas de criopreservación, ya que son procesos que requieren de un gran cuidado y rigurosidad.
- ✓ Realizar nuevos ensayos sobre el efecto del tiempo en la criopreservación empleando intervalos de tiempo más detallados (de una semana a dos meses, por ejemplo), para determinar el límite máximo de tiempo en el cual se pueden almacenar los PBMCs bajo las condiciones ya definidas y sin que se afecte de manera importante la viabilidad.

## IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Doke S, Dhawale S. Alternatives to animal testing: a review. *Saudi Pharma J.* 2015; 23(3): 223-229. Disponible en: DOI: 10.1016/j.jsps.2013.11.002
2. Ferreira D, Adegá F, Chaves R. The Importance of Cancer Cell Lines as in vitro Models in Cancer Methylome Analysis and Anticancer Drugs Testing. En: Lopez-Camarillo C (ed.). *Oncogenomics and Cancer Proteomics: Novel Approches in Biomarkers Discovery and Therapeutic Targets in Cancer.* Londres: IntechOpen; 2013. pp 139-166. Disponible en: DOI: 10.5772/53110
3. Daniels W, Fish D. Environmental factors for the growth of animal cells. *In Vitro.* 1974; 10(1): 284-294. Disponible en: DOI: 10.1007/BF02615310
4. Birch J, Cartwright T. Environmental factors influencing the growth of animal cells in culture. *J Chem Technol Biotechnol.* 1982; 32(1): 313-317. Disponible en: DOI: 10.1002/jctb.5030320135
5. Allen-Leigh B, Uribe-Zúñiga P, León-Maldonado L, Brown B, Lörincz A, Salmeron J et al. Barriers to HPV self-sampling and cytology among low-income indigenous women in rural areas of a middle-income setting: a qualitative study. *BMC Cancer.* 2017; 17(1):734. Disponible en: DOI: 10.1186/s12885-017-3723-5.
6. Anticona-Huaynate C, Pajuelo-Travezaño M, Correa M, Mayta-Malpartida H, Oberhelman R, Murphy L et al. Diagnostics barriers and innovations in rural areas: insights from junior medical doctors on the frontlines of rural care in Peru. *BMC Health Serv Res.* 2015; 15: 454. Disponible en: DOI: 10.1186/s12913-015-1114-7

7. Baust J, Campbell L, Harbell J. Best practices for cryopreserving, thawing, recovering, and assessing cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2017; 53(10):855-871. Disponible en: DOI: 10.1007/s11626-017-0201-y
8. Rodríguez-Hernández C, Torres-García S, Olvera-Sandoval C, Ramírez-Castillo F, Loera-Muro A, Avelar-Gonzalez F et al. Cell Culture: History, Development and Prospects. *Int J Curr Res Aca Rev.* 2014; 2(12):188-200. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/269932638\\_Cell\\_culture\\_History\\_Development\\_and\\_Prospects](https://www.researchgate.net/publication/269932638_Cell_culture_History_Development_and_Prospects) [Fecha de acceso: 17 de mayo del 2018]
9. Fogh J, Holmgren N, Ludovici P. A review of cell culture contaminations. *In vitro.* 1971; 7(1): 26-41. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007%2F02619002> [Fecha de acceso: 17 de mayo del 2018]
10. Drexler H, Uphoff C. Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. *Cytotechnology.* 2002; 39(2):75-90. Disponible: DOI: 10.1023/A:1022913015916
11. Merten O. Virus contaminations of cell cultures- A biotechnological review. *Cytotechnology.* 2002; 39(2): 91–116. Disponible: DOI: 10.1023/A:1022969101804
12. Kniss D, Summerfield T. Discovery of HeLa Cell Contamination in HES Cells: Call for Cell Line Authentication in Reproductive Biology Research. *Reprod Sci.* 2014; 21(8): 1015–1019. Disponible en: DOI: 10.1177/1933719114522518
13. Eperona S, De Groote D, Werner-Felmayer G, Jungi T. Human monocytoid cell lines as indicators of endotoxin: comparison with rabbit pyrogen



- and *Limulus* amoebocyte lysate assay. *J Immunol Methods*. 1997; 207(2):135-45. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022175997001129> [Fecha de acceso: 17 de mayo del 2018]
14. Gillet J, Varma S, Gottesman M. The Clinical Relevance of Cancer Cell Lines. *J Natl Cancer Ins*. 2013; 105(7): 452-458. Disponible en: DOI: 10.1093/jnci/djt007
  15. Bosshart H, Heinzelmann M. THP-1 cells as a model for human monocytes. *Ann Transl Med*. 2016; 4(21): 438. Disponible en: DOI: 10.21037/atm.2016.08.53
  16. Shaw G, Morse S, Ararat M, Graham F. Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *FASEB J*. 2002; 16(8):869-871. Disponible en: DOI: 10.1096/fj.01-0995fje
  17. Kaur G, Dufour J. Cell lines: Valuable tools or useless artifacts. *Spermatogenesis*. 2012; 2(1):1-5. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3341241/pdf/spmg-2-1.pdf> [Fecha de acceso: 16 de mayo del 2018]
  18. Unger R, Krump-Konvalinkova V, Peters K, Kirkpatrick C. *In Vitro* Expression of the Endothelial Phenotype: Comparative Study of Primary Isolated Cells and Cell Lines, Including the Novel Cell Line HPMEC-ST1.6R. *Microvasc Res*. 2002; 64(3):384-97. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0026286202924349> [Fecha de acceso: 17 de mayo del 2018]

19. Brooks D, Arlen P, Gao L, Kitchen C, Zack J. Identification of T-cell signaling pathways that stimulate HIV in primary cells. *PNAS*. 2003; 100 (22): 12955-12960. Disponible en: DOI: 10.1073/pnas.2233345100
20. Straub T, Höner zu Bentrup K, Orosz-Coghlan P, Dohnalkova A, Mayer B, Bartholomew R et al. *In vitro* cell culture infectivity assay for human Noroviruses. *Emerg Infect Dis*. 2007; 13(3):396-403. Disponible en: DOI: 10.3201/eid1303.060549
21. DesJardin L, Kaufman T, Potts B, Kutzbach B, Yi H, Schlesinger L. Mycobacterium tuberculosis-infected human macrophages exhibit enhanced cellular adhesion with increased expression of LFA-1 and ICAM-1 and reduced expression and/or function of complement receptors, FcγRII and the mannose receptor. *Microbiology*. 2002; 148(Pt 10):3161-3171. Disponible en: <http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/micro/148/10/1483161a.pdf?expires=1526775486&id=id&accname=guest&checksum=703B78D7FF4D092E884B3A58861BE2E8> [Fecha de acceso : 15 de mayo del 2018]
22. Hudu S, Alshrari A, Syahida A, Sekawi Z. Cell Culture, Technology: Enhancing the Culture of Diagnosing Human Diseases. *J Clin Diagn Res*. 2016; 10(3):DE01-5. Disponible en: DOI:10.7860/JCDR/2016/15837.7460
23. Allen D, Caviedes R, Cárdenas A, Shimahara T, Segura-Aguilar J, Caviedes P. Cell lines as in vitro models for drug screening and toxicity studies. *Drug Dev Ind Pharm*. 2005; 31(8):757-768. Disponible en: DOI: 10.1080/03639040500216246

24. Nissom P, Philp R. Genomics and Proteomics of Chinese Hamster Ovary (CHO) Cells. En: Al-Rubeai M, Fussenegger M (eds.) *Systems Biology. Cell Engineering*, vol 5. Dordrecht, Países Bajos: Springer; 2007. pp 49-68.  
Disponibile en: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/1-4020-5252-9\\_3](https://link.springer.com/chapter/10.1007/1-4020-5252-9_3)  
[Fecha de acceso: 17 de mayo del 2018]
25. Geiger T, Wehner A, Schaab C, Cox J, Mann M. Comparative proteomic analysis of eleven common cell lines reveals ubiquitous but varying expression of most proteins. *Mol Cell Proteomics*. 2012; 11(3):M111.014050.  
Disponibile en: DOI: 10.1074/mcp.M111.014050
26. Li F, Vijayasankaran N, Shen A, Kiss R, Amanullah A. Cell culture processes for monoclonal antibody production. *MAbs*. 2010; 2(5):466-479. Disponible en: 10.4161/mabs.2.5.12720
27. Kao T, Supowit S, Thompson E, Meyer W. Immunoreactive growth hormone production by human lymphocyte cell lines. *Cell Mol Neurobiol*. 1992; 12(5):483-498. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00711549> [Fecha de acceso: 17 de mayo del 2018]
28. Kim K, Evans G. Tissue Engineering: The Future of Stem Cells. En; Ashammakhi N, Reis R (Eds.). *Topics in Tissue Engineering* vol 2. EXPERTISSUES e-book. 2005. pp 2-21
29. Dumont J, Euwart D, Mei B, Estes S, Kshirsagar R. Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives. *Crit Rev Biotechnol*. 2016; 36(6):1110-1122. Disponible en: DOI: 10.3109/07388551.2015.1084266

30. Edmonson R, Broglie J, Adcock A, Yang L. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay Drug Dev Technol.* 2014; 12(4):207-218. Disponible en: DOI: 10.1089/adt.2014.573.
31. Pourahmad J, Salimi A. Isolated Human Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC), a Cost Effective Tool for Predicting Immunosuppressive Effects of Drugs and Xenobiotics. *Iran J Pharm Res.* 2015; 14(4):979. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4673925/pdf/ijpr-14-0979.pdf> [Fecha de acceso: 17 de abril del 2018]
32. Raff M. T and B Lymphocytes and Immune Responses. *Nature.* 1973; 242(1): 19-23. Disponible en: DOI: 10.1038/242019a0
33. LeBien T, Tedder T. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood.* 2008; 112(5):1570-1580. Disponible en: DOI: 10.1182/blood-2008-02-078071
34. Kisielow P. Development and selection of T cells: how many subsets? How many rules? *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2003; 51(6):407-414. Disponible en: <https://www.iitd.pan.wroc.pl/files/AITEFullText/51z6407.pdf> [Fecha de acceso: 17 de mayo del 2018]
35. Bourgeois C, Tanchot C. Mini-review CD4 T cells are required for CD8 T cell memory generation. *Eur J Immunol.* 2003; 33(12):3225-3231. Disponible en: DOI: 10.1002/eji.200324576
36. Reinherz E, Schlossman S. The differentiation and function of human T lymphocytes. *Cell.* 1980; 19(4):821-7. Disponible en: DOI: 10.1016/0092-8674(80)90072-0

37. Auffray C, Sieweke M, Geissmann F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2009; 27:669-692. Disponible en: DOI: 10.1146/annurev.immunol.021908.132557
38. Dorion L. *4 Downstream Applications of PBMC Isolation from Whole Blood*. Disponible en: <http://www.conversantbio.com/blog/4-downstream-applications-of-pbmc-isolation-from-whole-blood> [Fecha de acceso: 17 de mayo del 2018]
39. Club de Informática Médica y Telemedicina (Universidad de Panamá). *Linfocito Maduro*. Disponible en: <http://www.telmeds.org/atlas/hematologia/serieblanca/mononucleares/linfocito-maduro/> [Fecha de acceso: 10 de junio del 2018]
40. Hawkins B, Abazari A, Mathew A. Biopreservation Best Practices for regenerative medicine GMP manufacturing & focus on optimized biopreservation media. *Cell Gene Therapy Insights*. 2017; 3(5), 345-358. Disponible en: DOI: 10.18609/cgti.2017.035
41. Tuck M, Chan D, Chia D, Godwin A, Grizzle W, Krueger K et al. Standard Operating Procedures for Serum and Plasma Collection: Early Detection Research Network Consensus Statement Standard Operating Procedure Integration Working Group *J Proteome Res*. 2009; 8(1): 113–117. Disponible en: DOI: 10.1021/pr800545q
42. Ávila-Portillo L, Madero J, López C, León M, Acosta L, Gómez C et al. Fundamentos de Criopreservación. *Rev Colomb Obstet Ginecol*. 2006; 57(4): 291-300. Disponible en: <https://revista.fecolsog.org/index.php/rcog/article/view/468>. [Fecha de acceso: 30 de abril del 2018]

43. Pegg D. The history and principles of cryopreservation. *Semin Reprod Med.* 2002; 20(1):5-13. Disponible en: DOI: 10.1055/s-200223515
44. Mercado-de La Peña E. Caracterización de la Congelabilidad y Mejora de los Diluyentes de Crioconservación Espermática en Porcino Ibérico. [Tesis Doctoral]. Madrid: Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid; 2011. Disponible en: <http://eprints.ucm.es/14442/1/T33326.pdf> [Fecha de acceso: 24 de Junio del 2018]
45. Medeiros C, Forell F, Oliveira A, Rodrigues J. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology.* 2002; 57(1):327-344. Disponible en: [https://www.theriojournal.com/article/S0093-691X\(01\)00674-4/pdf](https://www.theriojournal.com/article/S0093-691X(01)00674-4/pdf) [Fecha de acceso: 30 de abril del 2018]
46. Baldi E, Muratori M (Eds.). *Genetic Damage in Human Spermatozoa.* Advances in Experimental Medicine and Biology. 1era ed. New York: Springer-Verlag; 2014. Disponible en: DOI: 10.1007/978-1-4614-7783-9
47. Marits P, Wikström A, Popadic D, Winqvist O, Thunberg S. Evaluation of T and B lymphocyte function in clinical practice using a flow cytometry based proliferation assay. *Clin Immunol.* 153(2):332-342. Disponible en: DOI: 10.1016/j.clim.2014.05.010
48. Yamagiwa S, Gray J, Hashimoto S, Horwitz D. A role for TGF-beta in the generation and expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells from human peripheral blood. *J Immunol.* 2001; 166(12):7282-7289. Disponible en: <http://www.jimmunol.org/content/166/12/7282.short> [Fecha de acceso: 27 de Junio del 2018].
49. Ichikawa A, Katakura Y, Teruya K, Hashizume S, Shirahata S. In vitro immunization of human peripheral blood lymphocytes: establishment of B cell

- lines secreting IgM specific for cholera toxin B subunit from lymphocytes stimulated with IL-2 and IL-4. *Cytotechnology*. 1999; 31(1-2):133-141. Disponible en DOI: 10.1023/A:1008063903946
50. Ohradanova-Repic A, Machacek C, Fischer M, Stockinger H. Differentiation of human monocytes and derived subsets of macrophages and dendritic cells by the HLDA10 monoclonal antibody panel. *Clin Transl Immunology*. 2016; 5(1): e55. Disponible en: 10.1038/cti.2015.39
51. Nazarpour R, Zabihi E, Alijanpour E, Abedian Z, Mehdizadeh H, Rahimi F. Optimization of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) Cryopreservation. *Int J Mol Cell Med*. 2012; 1(2):88-93. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3920500/pdf/ijmcm-1-088.pdf> [Fecha de acceso: 17 de abril del 2018]
52. Balint B, Ivanović Z, Petakov M, Taseski J, Jovčić G, Stojanović N et al. The cryopreservation protocol optimal for progenitor recovery is not optimal for preservation of marrow repopulating ability. *Bone Marrow Transplant*. 1999; 23(6):613-619. Disponible en: DOI: 10.1038/sj.bmt.1701623
53. Koryakina A, Frey E, Bruegger P. Cryopreservation of human monocytes for pharmacopeial monocyte activation test. *J Immunol Methods*. 2014; 405:181-191. Disponible en: DOI: 10.1016/j.jim.2014.01.005
54. Clarke D, Yadock D, Nicoud I, Mathew A, Heimfeld S. Improved Post-Thaw Recovery of Peripheral Blood Stem/ Progenitor Cells Using a Novel Intracellular-like Cryopreservation Solution. *Cytotherapy*. 2009; 11(4):472-479. Disponible en: DOI: 10.1080/14653240902887242
55. Germann A, Schulz J, Kemp-Kamke B, Zimmermann H, von Briesen H. Standardized Serum-Free Cryomedia Maintain Peripheral Blood

- Mononuclear Cell Viability, Recovery, and Antigen-Specific T-Cell Response Compared to Fetal Calf Serum-Based Medium. *Biopreserv Biobank*. 2011; 9(3):229-236. Disponible en: DOI: 10.1089/bio.2010.0033
- 56.von Bomhard A, Elssäser A, Ritschl L, Schwarz S, Rotter N. Cryopreservation of Endothelial Cells in Various Cryoprotective Agents and Media – Vitrification versus Slow Freezing Methods. *PLoS One*. 2016; 11(2):e0149660. Disponible en: DOI: 10.1371/journal.pone.0149660
- 57.Rogulska O, Petrenko Y, Petrenko A. DMSO-free cryopreservation of adipose-derived mesenchymal stromal cells: expansion medium affects post-thaw survival. *Cytotechnology*. 2017; 69(2):265-276. Disponible en: DOI: 10.1007/s10616-016-0055-2
58. Galmés A, Besalduch J, Bargay J, Novo A, Morey M, Guerra J et al. Long-term storage at -80°C of hematopoietic progenitor cells with 5-percent dimethyl sulfoxide as the sole cryoprotectant. *Transfusion*. 1999; 39(1):70-73. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1046/j.1537-2995.1999.39199116897.x> [Fecha de acceso:17 de abril del 2018]
- 59.Weinberg A, Song L, Wilkening C, Fenton T, Hural J, Louzao R et al. Optimization of storage and shipment of cryopreserved peripheral blood mononuclear cells from HIV-infected and uninfected individuals for ELISPOT assays. *J Immunol Methods*. 2010; 363(1):42-50. Disponible en: DOI: 10.1016/j.jim.2010.09.032
- 60.Kleeberger C, Lyles R, Margolick J, Rinaldo C, Phair J, Giorgi J. Viability and recovery of peripheral blood mononuclear cells cryopreserved for up to 12 years in a multicenter study. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1999; 6(1):14-19. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>



[pmc/articles/PMC95653/pdf/cd000014.pdf](https://pmc/articles/PMC95653/pdf/cd000014.pdf) [Fecha de acceso: 21 de junio del 2017]

61. Angel S, von Briesen H, Oh Y, Baller M, Zimmermann H, Germann A. Toward Optimal Cryopreservation and Storage for Achievement of High Cell Recovery and Maintenance of Cell Viability and T Cell Functionality. *Biopreserv Biobank*. 2016; 14(6):539-547. Disponible en: DOI: 10.1089/bio.2016.0046
62. Weinberg A, Song L, Wilkening C, Sevin A, Blais B, Louzao R et al. Optimization and limitations of Use of Cryopreserved Peripheral Blood Mononuclear Cells for Functional and Phenotypic T-Cell Characterization. *Clin Vaccine Immunol*. 2009; 16(8):1176-1186. Disponible en: DOI: 10.1128/CVI.00342-08
63. Ramachandran H, Laux J, Moldovan I, Caspell R, Lehmann P, Subbramanian R. Optimal Thawing of Cryopreserved Peripheral Blood Mononuclear Cells for Use in High-Throughput Human Immune Monitoring Studies. *Cells*. 2012; 1(3):313-324. Disponible en: DOI: 10.3390/cells1030313.
64. Hønge B, Petersen M, Olesen R, Møller B, Erikstrup C. Optimizing recovery of frozen human peripheral blood mononuclear cells for flow cytometry. *PLoS One*. 2017; 12(11):e0187440. Disponible en: DOI: 10.1371/journal.pone.0187440
65. Stone M, Murcia K, Dimapasac M, Yip B, Thompson M, Kunkel E. Maximizing PMBC Recovery and Viability: A Method to Optimize and Streamline Peripheral Blood Mononuclear Cell Isolation, Cryopreservation, and Thawing. *BioProcess International*. 2015; 13(4)S. Disponible en:

<http://www.bioprocessintl.com/wpcontent/uploads/2015/04/13-4-sup-Stone-SECURE.pdf> [Fecha de acceso: 21 de febrero del 2017]

66. Reidhammer C, Halbritter D, Weissert R. Peripheral Blood Mononuclear Cells: Isolation, Freezing, Thawing and Culture. *Methods Mol Biol.* 2016; 1304: 53-61. Disponible en: DOI: 10.1007/7651\_2014\_99.
67. Strober W. Trypan blue exclusion test for cell viability. *Curr Protoc Immunol.* 2011; Appendix 3: Appendix 3B. Disponible en : DOI : 10.1002/0471142735.ima03bs21.
68. Tran S, Puhar A, Ngo-Camus M, Ramarao R. Trypan Blue Dye Enters Viable Cells Incubated with the Pore-Forming Toxin HlyII of *Bacillus cereus*. *PLoS One.* 2011; 6(9): e22876. Disponible en: DOI: 10.1371/journal.pone.0022876
69. Malpique R, Ehrhart F, Katsen-Globa A, Zimmermann H, Alves P. Cryopreservation of adherent cells: strategies to improve cell viability and function after thawing. *Tissue Eng Part C Methods.* 2009; 15(3):373-386. Disponible en: DOI: 10.1089/ten.tec.2008.0410
70. Stylianou J, Vowels M, Hadfield K. Novel cryoprotectant significantly improves the post-thaw recovery and quality of HSC from CB. *Cytotherapy.* 2006; 8(1): 57-61. Disponible en: DOI: 10.1080/14653240500501021
71. Hamot G, Ammerlaan W, Mathay C, Kofanova O, Betsou F. Method validation for automated isolation of viable peripheral blood mononuclear cells. *Biopreserv Biobank.* 2015; 13(3):152-163. Disponible en: DOI: 10.1089/bio.2014.0054

72. Yokoyama W, Thompson M, Ehrhardt R. Cryopreservation and Thawing of Cells. *Curr Protoc Immunol*. 2012; 99(1):A.3G.1-A.3G.5. Disponible en: DOI: 10.1002/0471142735.ima03gs99

## X. ANEXOS

### ANEXO 1

**Tabla de Operacionalización de Variables**

<b>Variable</b>	<b>Independiente o dependiente</b>	<b>Tipo de variable</b>	<b>Definición conceptual</b>	<b>Categorías</b>	<b>Definición operacional</b>	<b>Indicador</b>
Viabilidad celular	Dependiente	Cuantitativa continua	Porcentaje de células que se encuentran biológicamente vivas en una población celular en un momento específico del tiempo.		Porcentaje de PBMCs vivos (que no se tiñen con el azul de tripano) en relación al número total de PBMCs (vivas + muertas) contadas en la cámara de Neubauer	% de PBMCs vivos durante el conteo
Recuperación celular	Dependiente	Cuantitativa continua	Porcentaje de células que permanecen vivas luego de someter a una población inicial de células a un tratamiento durante un tiempo establecido.		Porcentaje de PBMCs que permanecen vivos en un criovial luego de ser descongelados, en relación al número de PBMCs que se llevó inicialmente al criovial para ser criopreservados	% de PBMCs recuperados vivos luego de la criopreservación
Tipo de medio	Independiente	Cualitativa nominal	Medio líquido empleado para criopreservar células constituido por una serie de componentes biológicos y químicos, cuyo componente principal es el agente crioprotector (ej. DMSO)	Medio convencional	Medio de amplio uso en laboratorios compuesto de 90% de FBS y de 10% de DMSO	
				CryoStor CS10®	Medio comercial pre-formulado cuya composición está exenta de proteínas y compuesto animales y contiene 10% de DMSO	

<b>Variable</b>	<b>Independiente o dependiente</b>	<b>Tipo de variable</b>	<b>Definición conceptual</b>	<b>Categorías</b>	<b>Definición operacional</b>	<b>Indicador</b>
Tiempo de almacenamiento	Independiente	Cuantitativa discreta	Tiempo en el cual las células se encuentran almacenadas bajo condiciones de criopreservación		Tiempo en el cual los crioviales conteniendo PBMCs permanecen en congelación a -80 °C según las condiciones de los ensayos	Semanas
Tipo de contenedor de congelación	Independiente	Cualitativa nominal	Dispositivo al cual se introducen los crioviales y el cual permite la congelación de estos a una velocidad gradual y controlada para permitir una criopreservación óptima	Mr Frosty®	Contenedor plástico de gran empleo que requiere isopropanol y que será empleado para criopreservar PBMCs	
				CoolCell®	Contenedor (de congelación compuesto de) en base a material termoaislante que no requiere de isopropanol y será empleado para criopreservar PBMCs	

## **ANEXO 2**

### **Ficha de Consentimiento Informado**

Consentimiento informado para participar de una tesis de investigación

Título	Evaluación de la efectividad de dos medios de criopreservación para obtener una máxima viabilidad y recuperación de PBMCs
Investigador Responsable	Sergio Renán Quevedo Torres

#### 1. Propósito del estudio

Se le invita a participar de un estudio cuya finalidad principal es la de evaluar la efectividad de dos medios de criopreservación para criopreservar células mononucleares de sangre periférica (PBMCs). Durante el transcurso del proyecto se evaluarán otros factores importantes como el tiempo de almacenamiento o el uso de contenedores de congelación. Este estudio se realizará en las instalaciones del Laboratorio de Investigación en Enfermedades Infecciosas (LIEI-UPCH) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, bajo la supervisión del personal de laboratorio

Los PBMCs son células sanguíneas del sistema de defensa del organismo, que actúan contra agentes extraños como microorganismos causantes de enfermedades. Es por esto que los cultivos de PBMCs tienen múltiples aplicaciones en investigación clínica. El transporte y la conservación de estas y otras células para diferentes estudios, suponen un reto para los investigadores. La optimización de un método de criopreservación de células permite garantizar la integridad estructural y funcional de estas células al momento de su aplicación luego de almacenadas durante un período de tiempo.

## 2. Procedimientos

De decidir participar en nuestro estudio, usted llenará una ficha de datos con preguntas relacionadas a su historial médico y a sus hábitos cotidianos. De considerar que cumple con los criterios de inclusión, usted se encontrará apto para participar en el estudio. Posteriormente, se le tomará una muestra de sangre de 60 mL del antebrazo con ayuda de un sistema de jeringa hipodérmica y tubos BD Vacutainer® con heparina sódica (6 tubos de 10 mL). Dicho sistema permite mantener la aguja en el sitio de punción durante la colecta de sangre, evitando tener que sacar e introducir la aguja por cada tubo a llenar. El volumen requerido (60 mL) es mucho menor a la cantidad que uno dona en un banco de sangre (450 mL), por lo que no supone un riesgo a su salud. El volumen de sangre requerido permitirá obtener una cantidad de PBMCs comúnmente empleado para distintos ensayos inmunológicos luego de su criopreservación.

## 3. Riesgos

La toma de muestra de sangre es ligeramente dolorosa y existe un riesgo muy pequeño de que se pueda infectar si no se mantiene la higiene adecuada, además la toma de muestra del antebrazo puede ocasionar un pequeño hematoma (moretón) el cual desaparecerá en aproximadamente cinco días.

4. Beneficios  
Se le beneficiará con un examen de hemograma gratuito. Se entregará al participante los resultados de manera personal y confidencial.

## 5. Costos y compensación

No deberá pagar nada por participar en este estudio. Usted recibirá un refrigerio luego de la extracción de sangre.

6. Confidencialidad Nosotros guardaremos su información con códigos y no con nombres. Si los resultados de este seguimiento son publicados, no se mostrará ninguna información que permita su identificación. 7. Uso futuro de las muestras obtenidas

Deseamos conservar sus muestras culminado los ensayos. Estas muestras servirán, por ejemplo, para realizar ensayos funcionales en los PBMCs (linfocitos y monocitos) y en los derivados de éstos (macrófagos). Si no desea que sus muestras permanezcan almacenadas ni utilizadas posteriormente, aún puede seguir participando del estudio.

Autorizo que mis muestras de células sean utilizadas en estudios futuros:

SI (    )      NO (    )

## 8. Derechos del participante

Si decide participar en el estudio, puede retirarse de éste en cualquier momento. Si tiene alguna duda adicional, por favor pregunte al personal del estudio o llame a Sergio Quevedo Torres al teléfono 940 123 326.



## 9. Declaración y/o consentimiento

Acepto voluntariamente participar en este estudio, comprendo de las actividades en las que participaré si decido ingresar al estudio, también entiendo que puedo decidir no participar y que puedo retirarme del estudio en cualquier momento.

---

Nombre y Apellidos  
Participante

---

Fecha y Hora

---

Nombre y Apellido  
Investigador

---

Fecha y Hora

## FICHA DE DATOS DE LOS PARTICIPANTES

Evaluación de la efectividad de dos medios de criopreservación para obtener una máxima viabilidad y recuperación de PBMCs

**Nota: Los datos obtenidos de la presente ficha son CONFIDENCIALES y sólo serán vistos por el equipo de investigación. Dicha información no será publicada ni difundida bajo ningún término.**

### 1. Datos principales

Nombre:

Edad:              Sexo:

### 2. Historial Médico

- ¿Usted padece o ha padecido de las siguientes enfermedades?

Fibrosis pulmonar ( )   EPOC ( )   Cáncer ( )   Artrosis ( )   Artritis ( )

Gastritis ( )   Diabetes ( )   Otro tipo de enfermedad crónica ( )

Si marco otro, indicar cual:

- ¿Usted padece o ha padecido de tuberculosis?

- ¿Ha tenido un proceso infeccioso (respiratorio, gastrointestinal, urinario u otro) durante las últimas semanas?

- ¿Usted es portador del virus del VIH (SIDA)?   SI ( )   NO ( )

### 3. Hábitos cotidianos

- ¿Usted fuma regularmente?   SI ( )   NO ( )

Si la respuesta es SI, indicar la frecuencia:

-¿Usted ingiere bebidas alcohólicas regularmente? SI ( ) NO ( )

Si la respuesta es SI, indicar la frecuencia:

-¿Usted consume algún tipo de drogas? SI ( ) NO ( )

---

Fecha y Firma

### **ANEXO 3**

#### **Descripción de los medios y/o materiales comerciales a evaluar**



##### **A. CryoStor CS10®**

Descripción	Medio de criopreservación de formulación única comercializado por STEMCELL™ Technologies, diseñado para preservar células a bajas temperaturas entre -80 °C a -196 °C.
Características	<ul style="list-style-type: none"><li>-Listo para ser utilizado.</li><li>-No contiene suero ni otro tipo de proteínas.</li><li>-No contiene componentes animales.</li><li>-Fabricado bajo las GMP utilizando componentes de grado USP</li><li>-Se le realiza pruebas de esterilidad, endotoxinas y de control de calidad basado en células.</li></ul>
Composición	<ul style="list-style-type: none"><li>-DMSO al 10%.</li><li>-Otros componentes (no descritos).</li></ul>
Tipos de células recomendadas para ser utilizadas con el producto	Hepatocitos, células de sangre periférica, hibridomas, líneas celulares de mielomas, células madre mesénquimales, células embrionales y otros tipos de células extremadamente sensibles.

Fuente: STEMCELL™ Technologies. Página Web:  
<https://www.stemcell.com/cryostor-cs10.html>

## B. CoolCell®



Descripción	Contenedor de congelación comercializado por BioCision® que induce una tasa de congelación para los crioviales de -1 °C/minuto en un congelador a -80 °C sin necesidad de alcohol o ningún otro tipo de fluido.
Características	<p>-La simetría radial del criovial en el contenedor asegura una tasa de congelación uniforme para todos los crioviales.</p> <p>-Menor variabilidad de tasa de congelación en cada uso debido a la ausencia de alcohol (la degradación del alcohol en el tiempo genera variabilidad).</p> <p>-Listo para ser reutilizado en menos de 5 minutos de retirado de la congeladora.</p> <p>-Su uso no requiere la compra de insumos adicionales ni de etapas previas.</p> <p>-Su material de fabricación de baja retención de calor genera un mínimo impacto en otro tipo de muestras que se encuentren en la congeladora.</p>
Composición	<p>El CoolCell® está compuesto de una espuma de aislamiento reticulada de densidad uniforme. Al interior del contenedor, en el centro, se dispone de un anillo de aleación de metal.</p> <p>*Es importante llenar todos los soportes del contenedor antes de su uso.</p>
Tipos de células recomendadas para ser utilizadas con el producto	<p>Todo tipo de células:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Células madres</li> <li>-Células primarias</li> <li>-Líneas Celulares</li> </ul>

Fuente: Biocision®. Página Web:

[http://www.biocision.com/uploads/docs/lit\\_CoolCell\\_flyer\\_201212.pdf](http://www.biocision.com/uploads/docs/lit_CoolCell_flyer_201212.pdf)

## **ANEXO 4**

### **Composición y preparación de medios y soluciones**

#### **A. KRG libre de $\text{Ca}^{+2}$**

Reactivos:

Compuesto	Concentración final	Cantidad para 1L (volumen final)
NaCl	120 mM	7.02 g
KCl	4.9 mM	365 mg
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.49 mM	120 mg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.7 mM	231 mg
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	6.4 mM	1.144 g
Glucosa	10 mM	1.8 g
H <sub>2</sub> O MilliQ	-----	C.S.P. 1L

C.S.P: Cantidad suficiente para

Preparación e indicaciones:

1. Pesar todas las sales y compuestos en balanza analítica y trasvasarlos a un matraz Erlenmeyer que contiene agua MilliQ.
2. Homogenizar la solución con la ayuda de un agitador magnético.
3. Medir el pH y, de ser necesario, ajustar el pH en un rango entre 7.3 – 7.4.
4. Filtrar al vacío la solución dentro de la cabina de flujo laminar.
5. Trasvasar la solución filtrada estéril a una botella de vidrio autoclavada.
6. Llevar a control de esterilidad a 37 °C durante 24 horas.

7. De no observar precipitación relacionada a contaminación microbiana, almacenar la solución estéril en refrigeración.

B. Medio de criopreservación convencional

Reactivos:

Compuesto	Concentración	Cantidad para 0.5 mL (Volumen final por crivial)
FBS	90% (V/V)	450 $\mu$ L
DMSO	10% (V/V)	50 $\mu$ L

Preparación e indicaciones:

1. Realizar la mezcla de los volúmenes requeridos en cabina de flujo laminar, homogenizar suave y continuamente con ayuda de una micropipeta hasta obtener una sola fase.
2. Preparar alícuotas 0.5 mL de medio en criviales y posteriormente almacenarlos a -20 °C hasta su uso.

C. Medio de lavado

Compuesto	Concentración final	Cantidad para 25 mL (Volumen final por crivial descongelado)
DMEM	87.75% (V/V)	21.94 mL
HEPES	2.25% (V/V)	0.56 mL
FBS	10% (V/V)	2.5 mL

#### Preparación e indicaciones:

1. En la cabina de flujo laminar, trasvasar un volumen requerido de DMEM en un tubo cónico plástico (50 mL) y verter el volumen correspondiente de HEPES. Homogenizar hasta observar un cambio de coloración en todo el tubo.
2. Añadir el volumen correspondiente de FBS y homogenizar.
3. Nota: El medio preparado debe ser utilizado durante el día. Llevar el medio a atemperar a 37 °C (en Baño María o en incubadora) previo a su uso.